

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)



**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA EN
SELENIO Y VITAMINA E EN LISTERIOSIS MURINA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Antonio García Cabrera

Bajo la dirección de los doctores

Lucas Domínguez Rodríguez

Victor Briones Dieste

José Francisco Fernández-Garayzabal

Madrid, 2002

ISBN: 978-84-8466-430-7

© José Antonio García Cabrera, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA EN SELENIO
Y VITAMINA E EN LA LISTERIOSIS MURINA.**

JOSE ANTONIO GARCIA CABRERA

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN VETERINARIA**

Directores de la Tesis:

Dr. D. Lucas Domínguez Rodríguez
Dr. D. Victor Briones Dieste
Dr. D. José Francisco Fernández-Garayzábal

Madrid, 1995

*"De los dóciles y humildes
pueden salir los santos, pocas
veces los sabios."*

Santiago Ramón y Cajal

A Ana

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno llega al final de un camino tan sólo se recuerdan los buenos momentos, y se tiende a olvidar todas las dificultades y malos tragos que se han tenido que pasar. Sin embargo, no quisiera olvidarlos sin recordar antes a todos los que, de alguna manera, han colaborado a que este trabajo haya podido ver la luz.

A los tres directores de la presente Tesis:

Al Dr. Lucas Domínguez por numerosas razones imposibles de enumerar, por la paciencia que ha demostrado conmigo, su comprensión ante mi desánimo y su preocupación por mí, que ha ido más lejos de lo exigible a un director por su pupilo.

Al Dr. Víctor Briones por compartir tantos sacrificios, así como por su amistad.

Al Dr. José Francisco Fernández-Garayzábal, por sus acertados consejos y enfoques durante la realización del presente trabajo.

A D^a. Ana Doménech, porque sí valoro en mucho su capacidad de trabajo y rigor en el laboratorio, valoro aún más su voluntad y capacidad de sacrificio fuera de él.

Al Dr. Guillermo Suárez por sus consejos, y su ejemplo de dedicación a la Universidad.

Al Dr. Joaquín Goyache, porque siempre ha estado ahí, incluso en los momentos más críticos.

A los Drs. José Luis Blanco y Marta García, por tanto tiempo perdido conmigo.

A las Dras. María Teresa Cutuli, Ana Mateos y M^a Jesús Payá, por ofrecerme sus consejos y su ayuda desinteresada.

A la Dra. Esperanza Gómez-Lucía, por su carácter jovial y por tener siempre una palabra amable.

Al resto del equipo "listerias", Dra. Mar Blanco, compañera de fatigas durante todo este tiempo; Dr. José Antonio Vázquez-Boland, ejemplo de combatividad, incluso en inferioridad aquí y en Berlín; Dras. Alicia Gibello y Mónica Suárez, que aunque han sido las últimas incorporaciones no han regateado esfuerzos para ponerse a la altura del resto; D^a. Mayte Ripio y D. Gustavo Domínguez, claro ejemplo de que se puede disfrutar de la vida aunque sea en el laboratorio; D^a. Belén López, toda una

Al resto de compañeros de Microbiología del Departamento de Patología Animal I, Dr. Miguel Angel Moreno, porque ha sabido transmitir su carácter organizativo a todo aquello en lo que interviene; D. Ignacio Septién, por presentarme al "Orfeón Burgalés"; D^a Alicia Aranaz y D. Ernesto Liébana, "tanto monta, monta tanto..."; D. Louie LLames, por haber sabido apreciar lo mejor de las costumbres españolas; D^a. Mercedes García, por saber aclimatarse a cualquier situación; D. Félix Fernández y D^a. Pilar Capón, porque siempre han estado prestos a ayudar.

Al Dr. Ricardo de la Fuente, por su ejemplar actitud.

A los Drs. José Antonio Orden y José Antonio Ruiz-Santa Quiteria, compañeros de "cubículo", dispuestos a cualquier cosa para mejorar la convivencia.

Al resto de integrantes de Patología Infecciosa del Departamento de Patología Animal I, en la que me encuentro perfectamente integrado.

A los restantes miembros del Departamento de Patología Animal I, con los que la convivencia diaria es todo un placer.

Al Dr. Javier Cañón, del Departamento de Producción Animal, por su inestimable ayuda en el estudio estadístico.

A los Drs. Mariano Domingo y Alberto Marco, así como a D^a. Neus Prats y a D. Jaume Altímir, del Departamento de Anatomía Patológica e Histología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, sin cuya colaboración la parte histológica de este trabajo hubiera tenido mayores dificultades. A los tres últimos, además por una cena "inolvidable" en Madrid.

A todos aquellos que, por un imperdonable error, han quedado fuera de esta relación, muchas gracias.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.I- BREVE RESEÑA HISTORICA | 2 |
| 1.II- TAXONOMIA | 3 |
| 1.II.a- TAXONOMIA INTERGENERICA | 3 |
| 1.II.b- TAXONOMIA INTRAGENERICA | 6 |
| 1.III- ESTRUCTURA ANTIGENICA | 9 |
| 1.IV- EPIDEMIOLOGIA DE LA LISTERIOSIS | 12 |
| 1.IV.a- RESERVORIOS | 12 |
| 1.IV.b- VIAS DE TRANSMISION | 14 |
| 1.IV.c- MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS | 15 |
| 1.V- ENFERMEDAD | 18 |
| 1.V.a- PENETRACION EN EL HOSPEDADOR | 18 |
| 1.V.b- CINETICA DE LA INFECCION Y RESPUESTA INMUNE | 21 |
| 1.VI- FACTORES PREDISPONENTES | 24 |
| 1.VII- FORMAS CLINICAS | 28 |
| 1.VII.a- MENINGITIS Y ENCEFALITIS | 28 |
| 1.VII.b- INFECCION MATERNO-FETAL | 29 |
| 1.VII.c- INFECCIONES SEPTICEMICAS | 30 |
| 1.VII.d- OTRAS FORMAS CLINICAS | 31 |
| 1.VIII- DEFICIENCIAS NUTRICIONALES Y ENFERMEDAD | 32 |
| 1.IX- IMPORTANCIA BIOLOGICA DEL SELENIO | 36 |
| 1.IX.a- ACCIONES BIOLOGICAS. ENZIMAS. | 36 |
| 1.IX.b- TOXICIDAD DEL SELENIO | 39 |
| 1.IX.c- DEFICIENCIA EN SELENIO | 41 |
| 1.IX.d- SELENIO Y SISTEMA INMUNE | 43 |
| 1.IX.d.1- Influencia sobre la función fagocítica | 45 |
| 1.IX.d.2- Influencia sobre la producción de anticuerpos | 47 |
| 1.IX.d.3- Influencia sobre la función secretora de las células del sistema inmune | 49 |
| 1.IX.d.4- Influencia sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos T y B | 50 |
| 1.X- SELENIO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS | 52 |
| 2. OBJETIVOS | 55 |
| 3. MATERIAL Y METODOS | 58 |
| 3.I- MATERIAL | 59 |
| 3.II- MEDIOS DE CULTIVO | 59 |
| 3.III- SOLUCIONES | 60 |
| 3.IV- CEPAS | 62 |

| | |
|---|----|
| 3.V- ANIMALES DE EXPERIMENTACION | 63 |
| 3.VI- ALIMENTO Y AGUA DE BEBIDA | 63 |
| 3.VI.a- RATONES NORMALES | 63 |
| 3.VI.b- RATONES DEFICIENTES EN SELENIO Y VITAMINA E | 63 |
| 3.VII- OBTENCION DEL INOCULO | 64 |
| 3.VIII- INOCULACIONES | 66 |
| 3.VIII.a- INOCULACIONES ENDOVENOSAS | 66 |
| 3.VIII.b- INOCULACIONES ORALES | 66 |
| 3.IX- SACRIFICIOS Y OBTENCION DE LOS ORGANOS | 67 |
| 3.X- CALCULO DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50) POR VIA ENDOVENOSA | 71 |
| 3.XI- ESTUDIOS DE MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA | 72 |
| 3.XII- ESTUDIO DE MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS | 73 |
| 3.XIII- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ENDOVENOSA | 73 |
| 3.XIV- ESTUDIO DE LA INFECCION POR VIA ORAL | 76 |
| 3.XIV.a- SEGUN LA VIA DE INOCULACION EMPLEADA | 76 |
| 3.XIV.b- SEGUN LA CEPA EMPLEADA | 76 |
| 3.XIV.c- SEGUN DOSIFICACION UNICA O REPETIDA | 78 |
| 3.XV- ESTUDIO DE LA INFECCION POR VIA ORAL EN RATONES DEFICIENTES/NO DEFICIENTES | 78 |
| 3.XV.a- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA | 78 |
| 3.XV.b- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS | 81 |
| 3.XVI- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO | 81 |
| 3.XVI.a- PREPARACION DE LAS MUESTRAS | 81 |
| 3.XVI.b- ESTUDIO HISTOLOGICO | 83 |
| 3.XVII- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE SELENIO | 83 |
| 3.XVIII- VALORACION DE LA DEFICIENCIA EN SELENIO EN FUNCION DEL GRADO DE HEMOLISIS | 84 |
| 3.XIX- ESTUDIO ESTADISTICO | 84 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION | 86 |
| 4.I- VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO EN HIGADO | 87 |
| 4.II- ESTUDIOS DE MORTALIDAD | 91 |
| 4.II.a- DL ₅₀ VIA ENDOVENOSA | 91 |
| 4.II.b- MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA | 91 |

| | |
|---|-----|
| 4.II.c- MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS | 94 |
| 4.III- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ENDOVENOSA | 96 |
| 4.III.a- DOSIS $10^{4.5}$ | 96 |
| 4.III.b- DOSIS $10^{5.5}$ | 101 |
| 4.IV- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA | 105 |
| 4.IV.a- CON <i>Listeria monocytogenes</i> 4b | 105 |
| 4.IV.b- CON <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a | 119 |
| 4.IV.c- COMPARACION DE AMBAS SEROTIPOS | 119 |
| 4.V- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA INTRAGASTRICA | 123 |
| 4.VI- COMPARACION DE LAS VIAS ORAL-INTRAGASTRICA | 127 |
| 4.VII- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON 10^9 7 DIAS | 128 |
| 4.VIII- DEFICIENCIA EN SELENIO Y VITAMINA E Y SUSCEPTIBILIDAD A LA LISTERIOSIS | 132 |
| 5. CONCLUSIONES | 137 |
| 6. RESUMEN | 140 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 142 |

1. INTRODUCCION

1.1- BREVE RESEÑA HISTORICA

La historia del género *Listeria* es relativamente reciente, ya que arranca de la descripción que Murray, Webb y Swann hacen del microorganismo responsable de una epizootía entre los conejos y cobayos de su laboratorio en 1924 (Murray *et al.*, 1926). Al considerar que la bacteria aislada por ellos no había sido descrita aún deciden bautizarla como "*Bacterium monocytogenes*", al cursar el proceso infeccioso, como signo más característico, con una intensa monocitosis.

Sin embargo, parece que estos autores no fueron los primeros en encontrarse con *L. monocytogenes*. En 1911 Gustav Hülphers había aislado un microorganismo muy similar a partir de lesiones necróticas de hígado de conejo; desgraciadamente sus cultivos no fueron conservados y, por tanto, no pudieron ser contrastados con los de Murray, Webb y Swann. Por otra parte, en 1921 Dumont y Cotoni describen un microorganismo parecido a "*Bacterium monocytogenes*", aislado a partir de un caso de meningitis humana. Estos autores únicamente señalaron que se trataba de una bacteria muy parecida a la productora del Mal Rojo del cerdo. Este descubrimiento permaneció ignorado durante muchos años, al no ser correctamente interpretado, por lo que se consideran como auténticos descubridores del género a los autores citados en primer lugar.

Posteriormente, Pirie aísla una bacteria gram-positiva a partir de un brote epizootico en gerbos (*Tatera lobenguiae*) durante el curso de unas investigaciones sobre la peste humana en Sudáfrica. Al no encontrar referencia alguna sobre la enfermedad, cuya lesión más importante consistía en la existencia de focos necróticos en hígado, ni sobre el agente causal propuso denominarlas respectivamente "Tiger River Disease" atendiendo a la localización geográfica en que se produce (zona del río Tiger, en el estado libre de Orange), y "*Listerella hepatolytica*" (Pirie, 1927) en honor a Lord Lister.

A partir de ese momento se suceden las aportaciones que involucran a este microorganismo en la etiología de diversos procesos infecciosos. Así, Nyfeldt (1932) la aísla a partir de sangre de individuos enfermos con un cuadro clínico de mononucleosis ("*Listerella monocytogenes hominis*"), relacionándola por primera vez con un cuadro infeccioso humano. Pocos años después Burn establece los dos cuadros principales de la listeriosis humana, al

aislarla en 1933 de casos de septicemia neonatal, y en 1935 de cuadros de meningoencefalitis fatal en adultos. Sin embargo, los trabajos de Burn (1935, 1936) fueron pronto olvidados, ya que en 1951 Reiss, Potel y Krebs publican sus hallazgos sobre la "granulomatosis infantiseptica" de la que responsabilizan a "*Corynebacterium infantiseptica*", que, sin embargo, no era otra que *L. monocytogenes* tal y como demostró Seeliger posteriormente (Seeliger, 1952). Pero estos autores no fueron los primeros en confundir *L. monocytogenes* con una corinebacteria, en 1934 Schultz *et al.* describen como agente responsable de cuadros de meningoencefalitis humana a "*Corynebacterium parvulum*".

Con lo expuesto hasta ahora, debemos estar de acuerdo con las afirmaciones de Vázquez-Boland (1989), según las cuales la listeriosis neonatal en forma de "granulomatosis infantiseptica" habría sido observada con anterioridad a la descripción de Burn ya mencionada. Estos cuadros habrían sido recogidos bajo la denominación de "septicemia neonatal" y se habría responsabilizado de ella a "bastoncillos gram-positivos o argéntófilos", sin que se llegase a establecer su correcta etiología.

Las primeras aportaciones en relación con la listeriosis dentro del mundo de la Veterinaria, son debidas a Gill (1933, 1937). Este investigador fue el primero en relacionar una afección del sistema nervioso de las ovejas, la llamada "circling disease" o torneo (hoy por extensión toda afección del sistema nervioso central de los rumiantes por *Listeria*) con un microorganismo al que denomina "*Listerella ovis*".

Por fin, en 1940 Pirie propone como nuevo nombre del género el de *Listeria* ya que el de "*Listerella*" ya se había empleado con anterioridad para designar a un género vegetal.

1.II- TAXONOMIA

1.II.a- TAXONOMIA INTERGENERICA

Listeria es un género formado por bacilos gram-positivos, mesófilos, aerobios o anaerobios facultativos, no capsulados ni formadores de esporos, catalasa positivos, no miceliares y productores del ácido L(+)-láctico en el metabolismo fermentativo de la glucosa. Por todo esto, es fácil suponer que las relaciones taxonómicas intergenéricas de *Listeria* hayan

sido producto de gran controversia durante años.

En la 7ª edición del Bergey's Manual (Breed *et al.*, 1957) se incluyen dentro de la familia Corynebacteriaceae, con el género *Corynebacterium* como género típico, atendiendo a sus características morfológicas. Dentro de esa misma familia se incluía el género *Erysipelothrix*, con el que algunos autores consideraban muy relacionadas a *Listeria* (Jones, 1975). Posteriormente, y atendiendo a estudios de taxonomía numérica (Davis y Newton, 1969; Davis *et al.*, 1969; Stuart y Pease, 1972; citados por Vázquez-Boland, 1989; Stuart y Welshimer, 1973, 1974) y de composición química de la pared (Cummins y Harris, 1956) se demostró que las listerias eran distintas a las corinebacterias, y que incluso no estaban tan relacionadas con *Erysipelothrix* como se creía en un principio. Según estos estudios, parecían más emparentadas con *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Kurthia* y, sobre todo, *Brochotrix*. Por todo ello, en la 8ª edición del Bergey's Manual (Seeliger y Welshimer, 1974) el género *Listeria* aparece separado de la familia Corynebacteriaceae y es incluido entre los géneros de filiación incierta junto con *Erysipelothrix*, *Caryophanon* y la familia Lactobacillaceae, mientras que *Brochotrix* (por aquel entonces *Microbacterium thermophactum*) y *Kurthia* sí se mantuvieron dentro de la familia Corynebacteriaceae.

Esta separación de las corinebacterias fue confirmada por posteriores estudios de taxonomía numérica (Jones, 1975; Wilkinson y Jones, 1977; Jones *et al.*, 1986), quimiotaxonomía (Tadayon y Carrol, 1971; Srivastava y Siddique, 1973; Kamisango *et al.*, 1982; Collins y Jones, 1981; Fiedler y Seger, 1983; Fiedler *et al.*, 1984; citados por Vázquez-Boland, 1989; Jones *et al.*, 1979, 1986), composición del ADN e hibridación ADN-ADN (Stuart y Welshimer, 1973, 1974, citados por Vázquez-Boland, 1989; Rocourt *et al.*, 1982). Estos estudios confirmaron a su vez la estrecha relación entre *Listeria* y *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Kurthia*, observándose la máxima proximidad con *Brochotrix* (Kandler y Weiss, 1986; Seeliger y Jones, 1986; Jones, 1988). Géneros caracterizados todos ellos por poseer un bajo contenido de G+C en su ADN (36-42%), por no tener ácidos micólicos pero sí lipoteicoicos, por tener peptidoglicano de la variedad A1 gamma asociado a ácidos teicoicos del tipo polirribitol-fosfato, y por poseer como menaquinona principal la MK 7 (Jones *et al.*, 1972; Ruhland y Fiedler, 1987; Fiedler, 1988; citados por Vázquez-Boland, 1989; Seeliger y Jones, 1986).

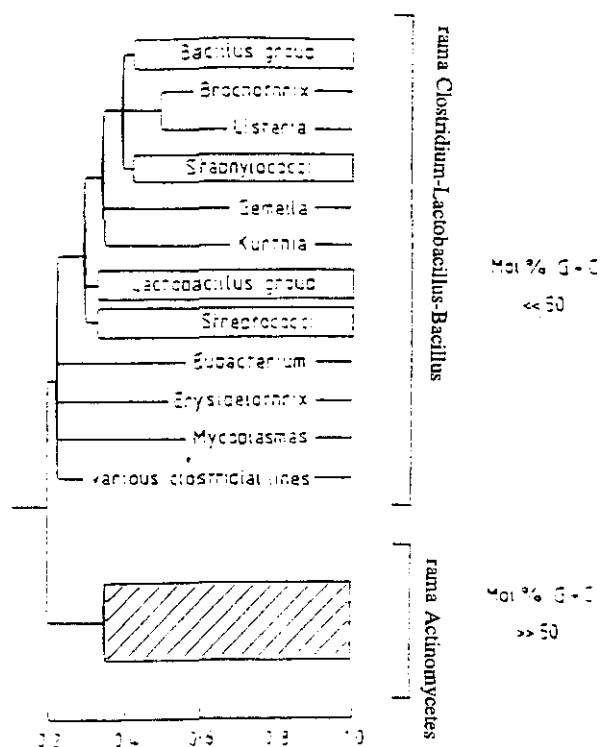


Figura 1- Dendrograma simplificado, en el que se pueden observar las relaciones filogenéticas del género *Listeria* con otras bacterias gram positivas (tomado de Jones, 1988).

| Taxon | Motile | Oxygen requirements | Growth at 35 °C | Catalase | H ₂ S production | Acid from glucose | Peptidoglycan group ¹ | Major peptidoglycan diamino acid | Major menaquinone | Fatty acid type | Mol % G + C |
|-----------------------|--------|---------------------|-----------------|----------|-----------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------|-------------|
| <i>Brochothrix</i> | - | Facultative | - | + | - | + | A | meso-DAP | MK-7 | S. A. I | 35.8-36.1 |
| <i>Erysipelothrix</i> | - | Facultative | - | - | - | - | B | L-Lysine | - | S. A. I, U | 36-40 |
| <i>Listeria</i> | - | Facultative | - | - | - | - | A | meso-DAP | MK-7 | S. A. I | 36-38 |
| <i>Lactobacillus</i> | - | Facultative | - | - | - | - | A | Lysine or meso-DAP or ornithine | - | S. U-C | 34-33 |
| <i>Kurthia</i> | - | Aerobic | - | - | - | - | A | L-Lysine | MK-7 | S. A. I | 36.7-37.9 |

Tabla 1- Caracteres diferenciales de los géneros *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Kurthia* y *Listeria* (tomado de Seeliger y Jones, 1986)

Todos estos estudios concuerdan con los de base filogenética (catalogación de secuencias de oligonucleótidos del ARN 16s) según los cuales *Listeria* se encuadraría dentro de la rama *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus* (porcentaje molecular de G+C < 55%) (Stackerbrandt y Woese, 1981, citados por Vázquez-Boland, 1989), con una relación más estrecha con *Brochotrix*, y ocupando con éste una posición intermedia entre *Bacillus* y el grupo *Lactobacillus/Streptococcus* (Stackerbrandt *et al.*, 1983; Ludwig *et al.*, 1984; citados por Vázquez-Boland, 1989; Rocourt *et al.*, 1982; Kandler y Weiss, 1986).

1.II.b- TAXONOMIA INTRAGENERICA

Durante muchos años el género *Listeria* estuvo constituido por una única especie, *L. monocytogenes*, en la que se encontraban incluidas todas las cepas aisladas. Esto conllevó que cepas hemolíticas y patógenas se encuadraran junto con cepas no hemolíticas y apatógenas, con la consiguiente confusión a la hora de intentar extraer conclusiones de tipo ecológico-epidemiológico de muestras no clínicas (Seeliger, 1976). Además se observó que *L. monocytogenes "sensu lato"* tal y como estaba descrita en la 8ª edición del Bergey's Manual (Seeliger y Welshimer, 1974) resultaba un taxón heterogéneo, no sólo desde el punto de vista de poder hemolítico y patógeno, sino incluso en cuanto al patrón de acidificación de determinados azúcares, llegándose a demostrar que estas diferencias no se limitaban a aspectos fenotípicos, sino que existían diferencias genómicas (Stuart y Welshimer, 1973).

Así, de las que actualmente componen el género, la primera especie distinta de *L. monocytogenes* propuesta fue *L. innocua* (Seeliger, 1981) en la que se incluyeron todas las cepas no hemolíticas y no patógenas que presentaran los factores antigénicos O-XI y O-XV, y que hubieran sido aisladas a partir de portadores sanos o de fuentes ambientales (Bojsen-Moller, 1967; citados por Vázquez-Boland, 1989; Welshimer, 1968; Ralovich, 1975; Seeliger, 1975, 1976; Seeliger y Schoofs, 1979). Por otro lado, se propuso la inclusión de las cepas aisladas por Ivanov en Bulgaria en 1955 a partir de ovejas con listeriosis (Ivanov, 1962) en otra especie que se denominaría "*L. bulgarica*" (Ivanov, 1975) o "*L. perhaemolytica*" (Seeliger *et al.*, 1982, citado por Vázquez-Boland, 1989). Estas cepas se caracterizaban por pertenecer específicamente a un único serovar, el 5, por presentar un marcado efecto hemolítico bizonal en agar sangre, y por ser patógenas exclusivamente para el ganado ovino (Ivanov, 1957, 1962). Estas cepas fueron caracterizadas posteriormente por el mismo autor (Ivanov, 1975).

Posteriormente, Rocourt *et al.* (1982) propusieron la división de *L. monocytogenes* "*sensu lato*" en cinco grupos genómicos distintos, mediante ensayos de hibridación ADN-ADN. Estos cinco grupos serían:

- grupo 1- constituido por las cepas "clásicas" de *L. monocytogenes* hemolíticas y patógenas (*L. monocytogenes* "*sensu stricto*") en el que se incluirían cepas de los serovares 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d y 7;
- grupo 2- en este grupo se incluirían las cepas hiperhemolíticas y patógenas del serovar 5;
- grupo 3- aquí se encuadrarían las cepas no hemolíticas y apatógenas de los serovares 4ab, 6a y 6b;
- grupo 4- en este grupo quedarían encuadradas las cepas "americanas" de *L. innocua* descritas por primera vez en Norteamérica, y que se diferencian de las "europeas" por presentar reacción positiva a la xilosa (Groves y Welshimer, 1977; Rocourt y Seeliger, 1985);
- grupo 5- este grupo quedaría reservado para cepas debilmente hemolíticas y apatógenas de distintos serovares.

Al observar que cada uno de estos grupos podían ser considerados como una especie distinta se ha considerado la división de *L. monocytogenes* "*sensu lato*" en cinco especies distintas:

- grupo 1- *L. monocytogenes*
- grupo 2- *L. ivanovii* (nombre definitivo de "*L. bulgarica*" (Seeliger *et al.*, 1984))
- grupo 3- *L. innocua*
- grupo 4- *L. welshimeri*
- grupo 5- *L. seeligeri*

A estas cinco especies habría que añadir otras especies descritas independientemente, *L. grayi* (Larsen y Seeliger, 1966, citados por Vázquez-Boland, 1989) y *L. murrayi* (Welshimer y Meredith, 1971), que a pesar de la controversia que su inclusión dentro de este género despertó en un principio, llegándose incluso a pretender su exclusión del mismo (Stuart y Welshimer, 1974), hoy son consideradas como miembros de un mismo taxón homogéneo, que confirma las similitudes fenotípicas y genotípicas encontradas, y que recibe

| Especie | CAMP test ¹ | | Hemólisis microplaca ² | Acidificación de azúcares | | |
|-------------------------|------------------------|------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------|----------------|
| | S. aureus | R. equi | | Xilosa | Ramnosa | Metil-Manósido |
| <i>L. monocytogenes</i> | (+) ³ | + | + intensidad variable | - | + | + |
| <i>L. ivanovii</i> | - | + | + intensidad fuerte | + | - | - |
| <i>L. seeligeri</i> | - | +/- ⁴ | + intensidad débil | + | - | - |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | (+) | + |
| <i>L. welshimeri</i> | - | - | - | - | (+) | + |
| <i>L. grayi</i> | - | - | - | + | - | + |

¹ Vázquez (1990); ² Domínguez et al. (1986); ³ resultados dudosos en algunos casos

⁴ cepa tipo (SLCC 3954, CIP 100100) es claramente positiva

Tabla 2- Identificación de *Listeria* mediante la determinación de la actividad hemolítica, CAMP test y patrón de acidificación de azúcares (Briones 1990).

el nombre de *L. grayi* (Rocourt *et al.*, 1992).

Mención aparte merece la primera especie descrita después de *L. monocytogenes*, *L. denitrificans*. Su inclusión dentro del género *Listeria* fue cuestionada durante muchos años, hasta que recientes estudios de secuenciación del ARNr 16s demostraron su pertenencia filogenética a la subdivisión corineformes-actinomicetos, bacterias gram-positivas de alto contenido en G+C (>55%), y ha sido transferida a un nuevo género con la denominación de *Jonesia denitrificans* (Rocourt *et al.*, 1987; Rocourt, 1988).

Para concluir este capítulo, y resumiendo todo lo expuesto hasta aquí, debe reseñarse que el género *Listeria* constituye un grupo homogéneo quimiotaxonómicamente, formado por 7 especies que tienen en común un contenido en G+C de 36-42%, poseen un peptidoglicano A1γ asociado a ácidos teicoicos del tipo polirribitol-fosfato, carecen de ácidos micólicos, poseen ácidos lipoteicoicos y presentan como menaquinona principal la MK 7. Estas 7 especies pueden dividirse en dos grupos desde el punto de vista filogenético, en uno se encuadrarían *L. grayi* (incluyendo a *L. murrayi*), y en el otro las cinco especies restantes (Rocourt, 1988).

1.III- ESTRUCTURA ANTIGENICA

Los estudios serológicos han sido una herramienta ampliamente utilizada en la clasificación de numerosos grupos bacterianos, no siendo *Listeria* una excepción a esto. Es más, la estructura antigénica en este género ha sido el origen de una de las más aceptadas clasificaciones basadas en criterios serológicos.

El primero en realizar estudios serológicos con distintas cepas de *Listeria* fue Seastone (citado por Domínguez, 1982), quien encontró una estrecha relación entre cepas de origen humano y cepas de origen animal, a excepción de la cepa tipo original de Murray que reaccionaba de forma distinta. También encontraron una gran similitud en el comportamiento serológico entre las distintas cepas de *Listeria* Webb y Barber en 1937 (citados por Vázquez-Boland, 1984).

Utilizando un gran número de cepas procedentes de Gran Bretaña y Estados Unidos

Seastone intentó establecer una relación entre las diferencias antigénicas de los grupos serológicos y el origen de las mismas. De esta manera, seguía el ejemplo de lo realizado con el género *Salmonella*, donde se había encontrado una relación serotipo-hospedador, relación que hoy se sabe es una excepción en este género. Desgraciadamente, las cepas británicas provenían de roedores y las americanas de rumiantes en su mayoría. Así, dado que las cepas europeas pertenecían a un grupo serológico (serovar 1) y las americanas a otro (serovar 4), Schultz por un lado y Julianelle y Pons por otro (citados por Vázquez-Boland, 1984) llegaron a la conclusión de que las listerias debían dividirse en dos grupos serológicos distintos, que estarían relacionados con el origen de la cepa (grupo Roedores y grupo Rumiantes), estableciendo, por tanto, una clasificación sero-ecológica. Las cepas de *Listeria* de procedencia humana pertenecerían indistintamente a uno o a otro grupo. Sin embargo, Paterson en 1939 y 1940 (Domínguez, 1982) consiguió identificar serologicamente distintos modelos antigénicos somáticos (O) y flagelares (H) usando los mismos métodos que Kauffman y White habían utilizado para la clasificación del género *Salmonella*, para lo que empleó 54 cepas de listerias. De esta manera estableció la base de la actual clasificación serológica del género *Listeria*. Con los resultados obtenidos, este autor dividió la especie *L. monocytogenes* en cuatro serotipos, demostrando además la no existencia de relación alguna entre serotipo y hospedador. De los cuatro serotipos encontrados, el 1, 3 y 4 se diferenciaban por sus antígenos somáticos; mientras que el 2 tenía la misma composición de antígenos somáticos que el 1, del que sólo se diferenciaba por sus antígenos flagelares.

Aunque el modelo de Paterson sigue todavía hoy vigente, se ha tenido que ampliar al demostrarse la existencia de otros factores antigénicos. En 1958 Seeliger (citado por Seeliger, 1961) subdividió el serotipo 4 en otros dos serotipos, que denominó 4a y 4b, basándose en diferencias de antígenos O. Donker-Voet (1957 y 1958, citado por Vázquez-Boland, 1984) añadió nuevos serotipos, 4c y 4d atendiendo a diferencias en antígenos O, y 1a y 3a por diferencias en los antígenos H.

En 1962 Ivanov describió el serotipo 5 al estudiar la listeriosis ovina. Este nuevo serotipo presenta un factor antigénico que no existe en los serotipos 1, 2, 3 y 4a al 4e (Cooper *et al.*, 1973), y difiere del resto de las listerias por su gran poder hemolítico. En 1966 Donker-Voet describió los serotipos 3c, 6 y 7, y en 1974 Stuart y Welshimer describieron el serotipo de *L. murrayi*.

| Serovar | Antígenos O | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------|----|-------|----|-----|------|-------|----------|--|--------|---|----|-----|------|-----|--------|---------|
| 1/2 | I | II | (III) | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | II | (III) | IV | | | | | | | | | | | | | |
| 4a | | | (III) | | (V) | | VII | | | IX | | | | | | | |
| 4ab | | | (III) | | V | VI | VII | | | (IX) * | X | | | | | | |
| 4b | | | (III) | | V | VI | | | | (IX) * | | | | | | | |
| 4c | | | (III) | | V | | VII | | | | | | | | | | |
| 4d | | | (III) | | (V) | VI | | VIII | | | | | | | | | |
| 4e | | | (III) | | V | VI | | (VIII) | | IX | | | | | | | |
| 5 | | | (III) | | (V) | VI | | (VIII) | | | X | | | | | | |
| 6a | | | (III) | | V | (VI) | (VII) | | | (IX) | | | | | XV | | |
| 6b | | | (III) | | (V) | (VI) | (VII) | (VIII) * | | (IX) * | X | XI | | | | | |
| 7 | | | (III) | | | | | | | | | | XII | XIII | | | |
| <i>L. grayi</i> | | | (III) | | | | | | | | | | XII | | XIV | XVI ** | |
| <i>L. murrayi</i> | | | (III) | | | | | | | | | | XII | | XIV | | XVII ** |

Tabla 3- Estructura antigénica del género *Listeria*.

* García *et al.*, 1991

** Vázquez-Boland *et al.*, 1988

Seeliger y Donker-Voet describieron los serotipos 4f, 4g y 6 (citado por Vázquez-Boland, 1984). Estos poseían una estrecha relación serológica y correspondían a cepas no hemolíticas y no patógenas de listerias; en 1979 Seeliger y Höhne encuadraron estos serotipos, que nunca habían sido aislados de material patológico alguno y sí de heces y del medio ambiente, en la nueva especie *L. innocua*. Más tarde Seeliger y Schoofs (1979) revisaron la designación de estos serotipos no hemolíticos encuadrándolos en el serotipo 6, que subdividieron en 6a y 6b (que corresponderían a los antiguos 4f y 4g) puesto que el factor VIII presente en el 6 y no en 4f y 4g no volvió a encontrarse al volver a analizar estas cepas. Sin embargo, Ralovich en 1984 puso de manifiesto la complejidad serológica de la especie *L. innocua*, ya que los serotipos 6a y 6b pueden dividirse a su vez en varios subserotipos. Todos estos cambios están reflejados en la 9ª edición del Bergey's Manual (Seeliger y Jones, 1986).

Nuestro grupo ha contribuido al establecimiento de la clasificación antigénica de *Listeria*, así, en 1988 Vázquez-Boland *et al.* describieron una nueva estructura antigénica para *L. grayi* y *L. murrayi*, según la cual estos dos serotipos compartirían tres factores antigénicos comunes, pero cada uno de ellos presentaría además al menos un factor propio. Igualmente, García *et al.* (1990) encontraron variaciones con respecto a la estructura antigénica somática admitida hasta ese momento para *Listeria*. Estas variaciones se circunscriben a la aparición del factor IX en cepas de serotipos que aparentemente no lo poseían (4ab y 6b), a la no aparición del mismo factor en todas las cepas del serotipo 4b, y a la no aparición del factor VIII en todas las cepas del serotipo 6b. Según esto la estructura antigénica del género *Listeria* sería como aparece en la tabla 3.

1.IV- EPIDEMIOLOGIA DE LA LISTERIOSIS

1.IV.a- RESERVORIOS

La enorme ubicuidad de *L. monocytogenes* ha sido puesta de manifiesto con numerosas referencias al aislamiento de este microorganismo a partir de una gran cantidad de sustratos. Así, se han descrito aislamientos de suelos cultivados, barbechos, lodos, etc. (Blenden y Szatalowich, 1967; Weis y Seeliger, 1975; Weis, 1975; Kampelmacher y Janssen, 1975; Mero y Steuer, 1981; Watkins y Sleath, 1981); de vegetales, como pastos, cultivos, hierbas,

ensilados mal conservados, hojas de arbustos (Welshimer, 1968; Welshimer y Donker-Voet, 1971; Weis y Seeliger, 1975; Vázquez-Boland *et al.*, 1992); y, de aguas residuales tratadas y sin tratar, aguas fluviales, lagos, efluentes de mataderos e industrias transformadoras (Dijkstra, 1981; Watkins y Sleath, 1981); todo lo cual constituye el llamado reservorio de origen telúrico.

También los animales constituyen un importante reservorio. De hecho *L. monocytogenes* ha sido aislada a partir de más de 42 especies de mamíferos, 22 de aves, 30 de peces, anfibios, crustáceos, arácnidos e insectos (Gray y Killinger, 1966; Hird y Genigeorgis, 1990). En este sentido, se consideran como los más importantes reservorios de *Listeria* a las personas y los animales sanos; llegándose a estimar que un 40% de la población humana son portadores fecales de *L. monocytogenes* (Lovett, 1989, como media de 29 estudios distintos), aunque entre la población sometida a riesgo de carácter profesional (matarifes, veterinarios, ganaderos, etc.) estos porcentajes pueden dispararse hasta un 70% (Kampelmacher y Van Noorle-Janssen, 1968, citados por Briones, 1990; McLauchlin, 1987). El porcentaje de portadores fecales entre los animales sanos también es enormemente variable, oscilando entre un 14% (Ralovich, 1984a) y un 52% (Skovgaard y Morgen, 1988). Es importante subrayar el importante papel desempeñado por los portadores fecales desde el punto de vista epidemiológico, pues contribuyen enormemente a la diseminación de *Listeria*, al constituir un elemento básico en la transmisión de la enfermedad bien de forma directa o bien de forma indirecta a través de sus productos (carne, leche, etc.) o contaminando con sus excrementos distintos productos de consumo humano, como son las verduras y hortalizas. En este sentido, cabe recordar el papel atribuido a las aves, que actúan como portadores fecales contaminando con sus excrementos los ensilados (Fenlon, 1985). Sin embargo, la principal fuente de contagio la constituyen los animales enfermos que diseminan la bacteria a través de su orina, heces y secreciones (Gray y Killinger, 1966).

A pesar de todo lo expuesto hasta aquí, debemos realizar algunas matizaciones. No podemos olvidar la existencia de especies no patógenas dentro del género (*Listeria innocua* especialmente) que también pueden ser aisladas de las mismas fuentes que las patógenas (Seeliger, 1976). Por otro lado, también debemos señalar que el número de individuos en los que se detecta *L. monocytogenes* en tracto gastrointestinal es muy superior al de aquellos que llegan a desarrollar algún tipo de manifestación clínica; en este sentido, nuestro grupo ha

descrito la excreción fecal de *L. monocytogenes* por parte de ratones inoculados experimentalmente por vía subcutánea que no desarrollaron signos clínicos y que presentaron muy escasas lesiones (Briones *et al.*, 1992), lo que sugiere otro posible origen de portadores fecales aparte de la ingestión.

1.IV.b- VIAS DE TRANSMISION

Pese a la gran ubicuidad de *Listeria* y su aislamiento a partir de tan amplio espectro de substratos, la verdadera importancia sanitaria de estos microorganismos radica en que la listeriosis es una enfermedad transmitida principalmente por los alimentos (Gómez Mampaso, 1993). Es importante señalar que el número de casos en 1990 (Rocourt, citada por Gómez Mampaso, 1993) se encontraba entre 0,22 y 7,4/millón de habitantes siendo EE.UU., Nueva Zelanda, Australia, Francia y Dinamarca los países con mayor incidencia, señalándose para España, en este estudio, una incidencia del 0,6/millón de habitantes.

La contaminación de los alimentos ha sido tema de bastante controversia durante los años en que la patogenia de la listeriosis era un tema "oscuro". Pero la existencia de una vía de transmisión indirecta a través de los alimentos fue puesta de manifiesto de manera indiscutible mediante el aislamiento de *Listeria* a partir de alimentos destinados al consumo humano. Entre los alimentos implicados de forma especial en esta transmisión se encuentran los productos lácteos, carnes y verduras, responsables de los últimos brotes de listeriosis (Schlech *et al.*, 1983; Fleming *et al.*, 1985; James *et al.*, 1985; Ho *et al.*, 1986; Bille, 1988). En este sentido, cabe recordar que *L. monocytogenes* ha sido aislada de leche cruda y pasteurizada (Lovett *et al.*, 1987; Fernández-Garayzábal *et al.*, 1986), quesos frescos y madurados (Marth, 1988b), en carnes de pollo, cordero y ternera (Lee y McClain, 1986; Lowry y Tiong, 1988), salsas preparadas (Farber, 1987, citado por Bracket, 1988), frutas, verduras y hortalizas (Schlech *et al.*, 1983; Ho *et al.*, 1986), así como de pescados y mariscos (Lennon *et al.*, 1984), sin olvidar el evidente riesgo de contaminación de los alimentos durante su manipulación y procesamiento industrial. De esta manera, los lugares húmedos y con restos de materia orgánica, sumideros, etc. constituyen importantes fuentes de contaminación exógena de los alimentos (Lowry y Tiong, 1988; Cox, 1989; Skovgaard y Morgen, 1988), así como manipuladores de los alimentos con una listeriosis latente (Ralovich,

1984b). Otro importante hecho que debe ser tenido en cuenta es la capacidad de *Listeria* de crecer a bajas temperaturas, lo que permitiría su proliferación en alimentos almacenados en refrigeración.

De lo señalado anteriormente, se desprende el carácter zoonótico de la listeriosis y la importancia de la transmisión a través de los alimentos (Hird, 1987). Sin embargo, algunos autores (Gómez Mampaso, 1993) señalan la alta frecuencia con que aparece alguna patología subyacente: 70% en Francia ó 82% en nuestro país.

Además de la transmisión por los alimentos no se deben descartar otras vías, como la transmisión directa de los animales al hombre, caso de la listeriosis cutánea de los veterinarios, contraída al manipular protegidos de manera indebida fetos abortados o el tracto genital de hembras enfermas (Blenden *et al.*, 1987). Es también posible la transmisión directa hombre-hombre, como ha ocurrido en algunos brotes intrahospitalarios (McLauchlin, 1987; Ho *et al.*, 1986).

Por último, la listeriosis de los recién nacidos puede tener dos orígenes: una transmisión directa madre-hijo (hematógena o producida en el momento del parto), o una transmisión nosocomial, de aparición tardía, debida al deficiente manejo de material clínico (termómetros, sondas, etc.) (McLauchlin, 1987).

En cuanto a la listeriosis animal, el carácter ubicuitario de *Listeria*, y su presencia en el suelo, la vegetación, aguas superficiales, etc. permiten su aparición en alimentos destinados a los animales, en especial ensilados y forrajes en mal estado o con un pH alto, existiendo una estrecha asociación entre el consumo de estos productos y la aparición de listeriosis (Gray y Killinger, 1966; Fenlon, 1985; Gitter *et al.*, 1986; Dijkstra, 1987). A su vez, los animales infectados juegan un importante papel en la transmisión a otros animales y al hombre, tanto de forma directa como indirecta.

1.IV.c- MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS

En los últimos brotes de listeriosis ocurridos en Estados Unidos y Canadá se procedió a una encuesta epidemiológica exhaustiva, con el fin de determinar las circunstancias y la

fuente de contagio (Schlech *et al.*, 1983; Fleming *et al.*, 1985; James *et al.*, 1985). En este sentido se utilizaron los datos concernientes a alimentación, pero también otros como los relativos al desarrollo de actividades al aire libre (jardinería), viajes, contacto con enfermos, educación, etc. Se tuvo en cuenta, para la definición de listeriosis, únicamente aquellos casos en los que el aislamiento de *L. monocytogenes* fue positivo, aún en los casos en que no estuvo acompañado de sintomatología (Schlech *et al.*, 1983; McLauchlin, 1990).

En la mayoría de los brotes se pudo determinar el origen común de los mismos gracias al empleo de marcadores epidemiológicos. Entre las técnicas utilizadas se mostraron especialmente útiles la fagotipia y la serotipia, aunque el empleo de técnicas basadas en la hibridación de ADN (sondas, patrones de restricción, PCR) y las técnicas inmunoenzimáticas presentan una gran proyección de futuro (Blanco *et al.*, 1993). Sin embargo, por el momento presentan como inconvenientes para su utilización de forma general un elevado coste, la necesidad de personal especializado, y el que no hayan demostrado una mayor efectividad con respecto a los métodos microbiológicos clásicos (Blanco *et al.*, 1993).

La fagotipia fue propuesta, al ampliar la capacidad de establecer relaciones entre distintas cepas, como una nueva aportación al estudio epidemiológico de la listeriosis. En 1985 Audurier *et al.* describieron un sistema de tipificación de *L. monocytogenes* de 27 fagos. Con los datos obtenidos en un brote en 1975, este grupo sugirió la posibilidad de que existiese una estrecha relación entre las estructuras utilizadas por los fagos como receptores y los antígenos somáticos, es decir, entre los fagovares y los serovares.

La fagotipia presenta una elevada especificidad, no produciéndose reacción de lisis con otras 20 especies bacterianas taxonómicamente próximas a *Listeria* (Lovett, 1989; Ortel, 1989b; Rocourt y Catimel, 1989; Loessner y Busse, 1990). La fagotipia y la serotipia han sido empleadas conjuntamente con resultados que pueden calificarse como excelentes (Espaze *et al.*, 1989). Sin embargo, algunos serovares, el 1/2 en especial, presentan una baja capacidad de fagotipia (es decir, reacción con al menos un fago), que en ocasiones alcanza tan solo un 29% de cepas fagotipables, lo que anula, en cierta medida, la validez de estas técnicas (McLauchlin, 1987; Saunders *et al.*, 1989).

El análisis serológico de casos aislados y brotes de listeriosis ha probado que el título

de anticuerpos frente a las listerias aumenta como consecuencia de la infección, no pudiéndose negar una correlación entre la incidencia de la enfermedad y la elevación de las tasas de anticuerpos (Larsen y Jones, 1972; López *et al.*, 1992), aunque el estudio de la presencia de aglutininas anti-*Listeria* en la población sana tanto humana como animal, pone en evidencia la existencia de un alto número de individuos que presentan títulos séricos con valores similares a los encontrados en los individuos enfermos (Jasinska, 1969, citado por Hyslop, 1975; Domínguez, 1982). Varias hipótesis han tratado de explicar este fenómeno, una de ellas implica a las listerias presentes en el intestino de los individuos como responsables de estas tasas de anticuerpos (Domínguez, 1982; Seeliger, 1987). Por otro lado, también se ha responsabilizado a la existencia de reacciones cruzadas entre los microorganismos del género *Listeria* con *Staphylococcus aureus* (Seeliger y Sulzbacher, 1956). Pero el hecho de que en muchas ocasiones los serovares aislados de portadores fecales no se correspondan con los aislados de procesos patológicos llama poderosamente la atención. En este sentido, nuestro grupo ha realizado estudios con especies relacionadas con *Listeria* que apuntan que la existencia de anticuerpos específicos frente a *Listeria* sólo sea posible por un contacto previo con este agente, y no por reacciones cruzadas con otros agentes bacterianos (López *et al.*, 1993).

Los serovares más frecuentemente aislados de individuos enfermos son el 4b y el 1/2a (Farber y Peterkin, 1991; Suárez, 1991). Según McLauchlin (1990), el serovar 4b es el responsable de la mayoría de los casos de listeriosis registrados por su laboratorio de 1967 a 1988 (64%), seguido por 1/2a (15%) y 1/2b (10%). Estas cifras coinciden con las señaladas por Goulet *et al.* (1989) en un estudio llevado a cabo en Francia entre 1983 y 1986, en el que los porcentajes son respectivamente 62%, 22% y 13%. En cuanto al resto de serovares, McLauchlin (1990) les concede valores del 6% de casos de listeriosis producidos por serovares 4 distintos al 4b, un 4% para 1/2c y, por último, un 1% para los serovares 3. Gómez Mampaso (1993) afirma que en nuestro país hasta 1986 los serotipos del grupo 4 eran responsables del 92% de los casos de listeriosis, mientras que los del 1/2 lo eran del 8% restante; este autor cita, asimismo, un estudio de Rocourt de 1990, en el que el 54% de los casos son debidos al serogrupo 4, y el 43% al 1/2.

1.V- ENFERMEDAD

Tal y como se ha señalado en el capítulo de epidemiología, el número de casos de listeriosis resulta pequeño con respecto a la ubicuidad de estos microorganismos. Parece obvio, por tanto, que el desarrollo de la listeriosis precisa de una combinación de factores de patogenicidad de *Listeria* y de susceptibilidad del hospedador (Kampelmacher y Janssen, 1969), lo que parece demostrar lo acertado de la calificación de "agentes oportunistas" realizada por Simpson en 1971 sobre estos microorganismos (citado por Fernández-Garayzábal, 1984). De tal forma que hoy se considera más importante la existencia de factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad que la mera entrada del microorganismo en un posible hospedador. Los factores predisponentes más conocidos son la depresión de la inmunidad de base celular durante la gestación, inmadurez del Sistema Inmune en los recién nacidos, inmunosupresión terapéutica en trasplantados, linfomas, tratamientos con antiácidos, etc. (Siddique *et al.*, 1985; Stamm *et al.*, 1982; Briones, 1993). Sin embargo, todavía existen casos que no pueden ser explicados por la existencia de estos factores, lo que ha llevado a los investigadores al convencimiento de que no se conocen todos los factores predisponentes que pueden intervenir en la listeriosis.

Afortunadamente el modelo experimental murino permite observar todas las formas de listeriosis que podemos encontrar en el hombre y en nuestras especies domésticas (Domingo *et al.*, 1993). Este modelo también permite el estudio de la respuesta inmune de base celular, así como los mecanismos que utiliza *Listeria* para producir la infección, y se considera válido para extrapolar los resultados al hombre (Stelma *et al.*, 1987).

1.V.a- PENETRACION EN EL HOSPEDADOR

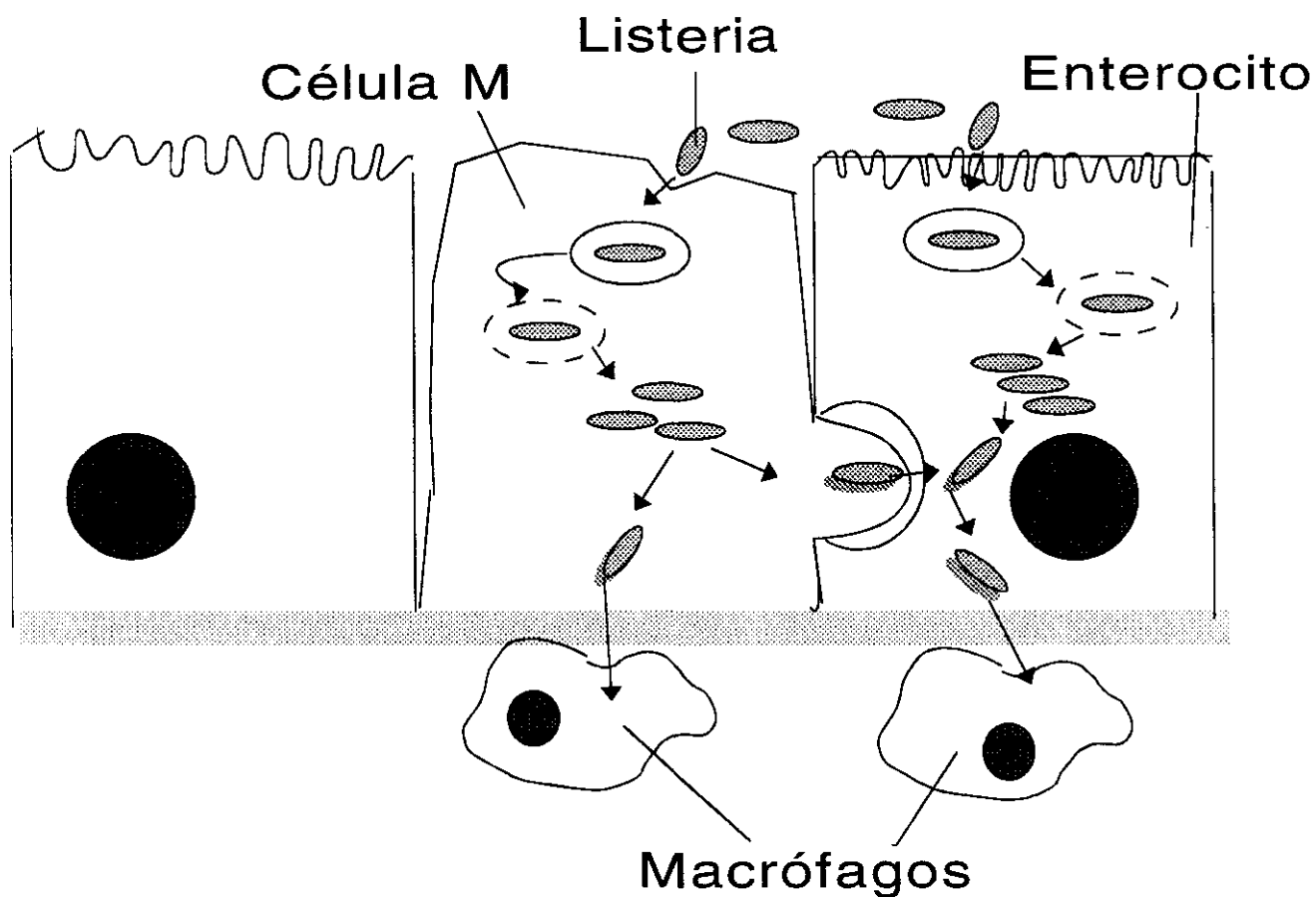
La listeriosis presenta tres cuadros clínicos principales (abortos, septicemias y encefalitis), así como otra serie de cuadros que suelen necesitar del establecimiento de una septicemia previa. De forma general, tal y como confirman los últimos brotes aparecidos entre la población humana, a excepción del brote francés de 1992 que no ha podido relacionarse claramente con alimento alguno (Dehaumont, 1993), todos ellos se encuentran asociados al consumo de productos lácteos, carnes y verduras contaminadas (Schlech *et al.*, 1983; Fleming *et al.*, 1985; James *et al.*, 1985; Ho *et al.*, 1986; Bille, 1988), y en los animales casi siempre

se encuentre asociada al consumo de ensilado en mal estado (Gray y Killinger, 1966; Fenlon, 1985; Audurier *et al.*, 1985; Gitter, 1985; Dijkstra, 1987), por tanto, podemos afirmar que la vía de entrada de *Listeria* en el hospedador es la oral (Domingo *et al.*, 1993), si exceptuamos la forma encefálica en los rumiantes que trataremos posteriormente. Sin embargo, aún existen dificultades para conocer el mecanismo exacto de la infección por vía oral, como son la necesidad de emplear altísimas dosis infectantes para reproducir la enfermedad experimentalmente, y, de forma especial, la variabilidad en la respuesta de individuos en condiciones similares.

Dos son las vías de penetración propuestas a partir de la luz intestinal. Racz y col. (citados por Gaillard *et al.*, 1987; y por Briones, 1990), mediante estudios de microscopía electrónica, describen la invasión, en una primera fase, de los enterocitos del intestino delgado, y la multiplicación de *L. monocytogenes* en el interior de esas células. Las listerias libres en el citoplasma podrían pasar a enterocitos adyacentes, o bien salir al exterior donde serían capturadas por células fagocíticas. Esta teoría permite a *L. monocytogenes* eludir en cierta medida la acción bactericida de los macrófagos de la lámina propia, convirtiéndola en un parásito intracelular capaz de invadir células no fagocíticas.

Esta hipótesis se ve reforzada en primer lugar por el hecho de que otros epitelios (conjuntiva, epitelio nasal) pueden servir como lugares iniciales de la infección (Gray y Killinger, 1966); y, en segundo lugar por la capacidad de *Listeria* de penetrar y multiplicarse en células epiteliales *in vitro* (Gaillard *et al.*, 1987; Cossart y Mengaud, 1989; Meyer *et al.*, 1992). En esta fase la hemolisina desempeña un importante papel en la diseminación extraintestinal de *Listeria* (Roll y Czuprynski, 1990), ya que una vez en el interior de la célula hospedadora *L. monocytogenes* depende de ella para su multiplicación, al intervenir en su liberación del fagosoma (Gaillard *et al.*, 1987; Kuhn *et al.*, 1988; Portnoy, 1992).

La segunda hipótesis (MacDonald y Carter, 1980; Marco *et al.*, 1992b) sitúa la puerta de entrada en unas células especializadas de las placas de Peyer, denominadas células M, a partir de las que *Listeria* sería rápidamente fagocitada por los macrófagos íntimamente asociados a estas células, sin que se produzca multiplicación en las células M. Por tanto, en esta hipótesis la difusión de las listerias en el hospedador depende únicamente de su capacidad de multiplicarse dentro de los macrófagos. Es conocida la capacidad de las células



Teoría de McDonald/Carter

Teoría de Racz

Figura 2- Esquema de penetración de *Listeria* en el hospedador.

M para procesar antígenos solubles intestinales y de fagocitar procariotas; de hecho los Reovirus utilizan esta vía para atravesar la barrera intestinal (Wolf *et al.*, 1981, citado por Briones, 1990).

Sin embargo, pueden considerarse no excluyentes, y es posible que *Listeria* utilice ambas vías para penetrar a través del epitelio intestinal (Czuprynski, 1994). Una vez en el citoplasma *Listeria* es capaz de inducir la polimerización de filamentos de actina a su alrededor, lo que le sirve para desplazarse por el citoplasma, e incluso para penetrar en células adyacentes sin salir al medio externo (Tielney y Tielney, 1993; Czuprynski, 1994) (Fig. 2).

Por último, es preciso reseñar otra posible vía de infección sustentada en la idea de que *Listeria* puede escapar a la acción del Sistema Inmune si se encuentra con una mucosa o epitelio alterados. Barlow y McGorum demostraron que las ovejas en época de cambio de dentición y sometidas a factores de alto riesgo, como es la alimentación mediante ensilado, presentaban una mayor prevalencia de encefalitis por listerias (Barlow y McGorum, 1985). *Listeria monocytogenes* alcanza las terminaciones nerviosas de los pares craneales, principalmente trigémino, facial y vestibulococlear (Domingo *et al.*, 1993), y avanza de forma centrípeta hacia el cerebro por el interior de los axones (Otter y Blakemore, 1989), pudiéndose producir lesiones de tipo inflamatorio. Una vez en el cerebro, continúa su migración a través de las fibras nerviosas, produciéndose la aparición de fuertes reacciones inflamatorias en cuyo inicio predominan polimorfonucleares neutrófilos, que posteriormente son sustituidos por macrófagos activados. Esta fuerte reacción inmunopatológica que se produce en el cerebro puede ocasionar graves alteraciones tisulares (microabscesos, demielinización, necrosis) responsables a su vez de los síntomas clínicos apreciados en este cuadro (Charlton y García, 1977; Domingo *et al.*, 1993). También se ha sugerido que las heridas de cabeza y cuello podrían actuar de igual forma (Pohjanvirta y Huttunen, 1985), afirmación que se ha visto apoyada por los resultados de nuestro grupo, al demostrar la aparición de meningitis en animales inoculados por vía subcutánea (Prats *et al.*, 1992a, 1992b).

1.V.b- CINETICA DE LA INFECCION Y RESPUESTA INMUNE

Los estudios relativos a la cinética de la enfermedad, la diseminación intraorgánica,

histopatología, etc. han necesitado el desarrollo de un modelo experimental en el que se pudieran investigar éstos y otros extremos. En este sentido son numerosos los estudios realizados sobre la listeriosis experimental en el ratón desde los primeros trabajos de Mackaness en 1962 (citado por Briones, 1990). El carácter de parásito intracelular de *Listeria* y la inmunidad de base celular como respuesta a la infección confieren a la listeriosis experimental características peculiares en lo que a sus mecanismos patogénicos, mediadores del Sistema Inmune, modulación de la respuesta inmune, etc., se refiere.

La cinética de la infección sigue un patrón ampliamente aceptado por los diversos autores (Wilkinson y Hall, 1971; Cheers *et al.*, 1978; Kongshaven y Skamene, 1984). De los estudios realizados en ratones se conoce la existencia de varias fases en la resistencia a la enfermedad. A los 10 minutos de una inoculación endovenosa con una dosis subletal, el 90% de las células han sido capturadas por los macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer) y la mayoría de las restantes por los del bazo (Kongshaven y Skamene, 1984); a las 6 horas se ha producido una destrucción de un 90% de las bacterias viables existentes en estos órganos imputable a los macrófagos tisulares (Mainou-Fowler *et al.*, 1988).

En el caso de la vía intraperitoneal la infección sigue una pauta muy similar a la reseñada para la vía endovenosa, si bien en este caso los macrófagos peritoneales capturan una cierta cantidad de las bacterias inoculadas (Archinal y Wilder, 1988b). Cuando la vía empleada es la oral, son los macrófagos de la lámina propia del intestino los responsables de la fagocitosis de las listerias que han conseguido atravesar el epitelio, independientemente de la ruta seguida para hacerlo. También es éste el patrón aceptado para otras vías de infección a través de epitelios, como el conjuntival y el nasal (Kautter *et al.*, 1963; Miller y Burns, 1970; Pohjanvirta y Huttunen, 1985).

Tras esta primera fase, las listerias comienzan a multiplicarse de forma logarítmica en el interior de los macrófagos del hígado y bazo, alcanzando el máximo de población de listerias a los 2-3 días del comienzo de la infección, según la vía. Se ha podido comprobar que estos macrófagos infiltrados en los tejidos provienen de la médula ósea a través del torrente circulatorio, ya que el uso en esta fase de sustancias incrementadoras de la respuesta macrofágica o de la monocitopoyesis (RX, vinblastina, carragenina, ciclofosfamida, etc.) aumenta de manera considerable el número de células macrofágicas y, por tanto, el de

bacterias por aumento del número de lugares en los que pueden multiplicarse.

Otra serie de mediadores de la respuesta monocítica que intervienen en esta fase son el CSF (Colony Stimulating Factor) (Cheers y Stanley, 1988; Mielke *et al.*, 1993), y el TNF (Tumor Necrosis Factor) (Nakane *et al.*, 1988a; Mielke *et al.*, 1993). En resumen, podemos afirmar que se produce una respuesta inmune no específica mediada por fagocitos profesionales, entre los que predominan los monocitos y donde podemos encontrar, a su vez, numerosos polimorfonucleares neutrófilos. Este aflujo de células inflamatorias da lugar a los granulomas que constituyen la lesión específica de la listeriosis.

A partir de este momento, comienza una tercera fase, en la que el desarrollo de una inmunidad de base celular, basada en macrófagos activados por linfoquinas originadas por linfocitos T sensibilizados provoca una rápida inactivación de las listerias (Kongshaven y Skamene, 1984; Mainou-Fowler *et al.*, 1988). Esta activación de los macrófagos destruye rápidamente a las bacterias por un incremento de su poder bactericida. La sensibilización y proliferación de los linfocitos T exige, previamente, el contacto entre *L. monocytogenes* y los macrófagos responsables de su presentación a las células T (Goosens *et al.*, 1988). En este proceso juegan un importante papel las moléculas Ia superficiales (Deschryver-Keeskemeti *et al.*, 1988). Una vez activados los linfocitos T inducen una activa monocitopoyesis mediada por linfoquinas como el CSF, IL2 (interleuquina 2), α , β y γ interferón, etc. (Kratz y Kurlander, 1988; Nakane *et al.*, 1989; Mielke *et al.*, 1993).

La secreción de IFN-gamma impide la salida de los microorganismos de los fagosomas y, por ende, su multiplicación en el citoplasma (Czuprynski, 1994; Fujiki y Tahaka, 1988; Higginbotham *et al.*, 1992). Al parecer este efecto del IFN-gamma se debe a una mayor producción de peróxidos (Higginbotham *et al.*, 1992; Tielney y Tielney, 1993). Sin embargo, esta función del IFN-gamma no parece estar tan clara, ya que Mielke *et al.* (1993) afirma que, basados en experimentos *in vitro*, sí parece actuar de la forma indicada, esto es, impidiendo la salida de listerias al citoplasma celular; pero, por otra parte, su aparición no coincide con la etapa de desaparición de las listerias, por lo que parece que su acción sería más resultado de las funciones proinflamatorias durante la infección, que un efecto sobre la capacidad bacteriostática celular. Este mismo autor afirma que es el TNF-alfa el que puede estimular o coestimular la producción de estos compuestos de oxígeno, actuando así sobre la capacidad

antibacteriana de los fagocitos.

Llegado este punto, el hospedador puede controlar definitivamente la infección, reducir el número de listerias y, en el plazo de aproximadamente una semana eliminarlas, o bien sufrir una septicemia (Briones, 1990). A este respecto parece que la limitación del crecimiento bacteriano en los primeros estadios de la infección se debe a la presencia de un alto número de linfocitos T reactivos (Goosens *et al.*, 1988).

La inmunidad de tipo humoral no es predominante en el establecimiento de la resistencia a la infección por *Listeria*, lo cual se demuestra por el hecho de que no sea posible conferir una inmunidad de tipo pasivo mediante el empleo de suero hiperinmune (Miki y Mackaness, 1964).

1.VI- FACTORES PREDISPONENTES

La resistencia o susceptibilidad a la infección por *L. monocytogenes* en el ratón está regulada por un gen autosomal dominante (gen Lr, *Listeria* resistance) que se expresa durante la multiplicación logarítmica manteniéndola bajo control (Mandel y Cheers, 1980). Esta resistencia parece residir en la capacidad de desarrollar una inmunidad no específica que aparecería en la 2ª fase de la infección, originándose una cierta inmovilización de los macrófagos integrantes de los infiltrados inflamatorios, o una disminución de su capacidad para eliminar las listerias (Czuprinsky *et al.*, 1985). La ausencia o disminución de respuesta en este momento puede originar una septicemia con posible muerte del animal (Mandel y Cheers, 1980).

La mayoría de los casos de listeriosis humana parecen ocurrir en individuos que presentan algún tipo de factor subyacente que conduce a una alteración de la respuesta inmune mediada por células T (Farber y Peterkin, 1991). Aunque todavía parecen existir algunas lagunas en esta afirmación, ya que ello implicaría una gran incidencia de listeriosis entre los enfermos de SIDA, y esto no ocurre así (Schuchat *et al.*, 1991; Decker *et al.*, 1991; Berenguer *et al.*, 1991; Farber y Peterkin, 1991), aunque parece que la incidencia de meningitis y septicemia por *Listeria* entre estos enfermos se encuentra en ascenso (Jurado *et al.*, 1993); además este autor señala la existencia de casos en individuos que no presentaban

ningún tipo de factor predisponente.

Es fácil deducir la importancia que tiene en la listeriosis la capacidad de respuesta inmune celular, atendiendo al mecanismo patogénico de *L. monocytogenes*. Así, el tratamiento con inmunomoduladores modifica la susceptibilidad de éste a la infección, incrementándola o disminuyéndola. De forma general, podemos afirmar que cualquier inmunomodulador que estimule la respuesta macrofágica y que sea inoculado antes de la infección aumenta la resistencia a la misma; por tanto, la acción de inmunoestimulantes reduce considerablemente la susceptibilidad del ratón a la infección por *L. monocytogenes*. A este respecto la acción de las citoquinas, como el IFN- γ (Nakane *et al.*, 1988b), o el TNF (Nakane *et al.*, 1988a; Mielke *et al.*, 1993), o las IL1, IL2 ó IL12 (Mielke *et al.*, 1993) tienen un efecto protector; y, de hecho, el tratamiento previo con inmunoglobulinas anti-IFN- γ y anti-TNF aumenta la susceptibilidad a la infección por *L. monocytogenes* en ratones normales (Nakane *et al.*, 1989); sin embargo, Mielke *et al.* (1993) afirma que la acción del IFN- γ , es más un resultado sus funciones proinflamatorias que una acción directa sobre los mecanismos bacteriostáticos de la célula.

Por el contrario, y tal como cabría esperar tras lo expuesto en el párrafo anterior, el tratamiento con inmunosupresores, como la carragenina (Stelma *et al.*, 1987) o ciclosporina (Hang *et al.*, 1987), permite la producción de la enfermedad con dosis de *L. monocytogenes* considerablemente bajas. En este sentido, diversos autores (Stamm *et al.*, 1982; Gómez Mampaso *et al.*, 1987; Gómez Mampaso, 1993) han alertado sobre las posibles complicaciones que *L. monocytogenes* puede ocasionar en enfermos sometidos a inmunosupresión terapéutica (trasplantados renales o cardíacos por ejemplo). Asimismo, los individuos que presentan un cuadro de inmunodeficiencia adquirida (Ridgway y Brown, 1989, Gómez Mampaso, 1993), con la salvedad ya comentada en el caso del SIDA, o congénita (Deschryvert-Kecskemeti y Bancroft, 1988) también presentan una mayor susceptibilidad frente a la listeriosis. Asimismo, otras enfermedades como la diabetes o las hepatopatías pueden predisponer a padecer la listeriosis (Gómez Mampaso, 1993; Ribiere *et al.*, 1990; Schuchat *et al.*, 1991).

Además de los inmunomoduladores, también existen otros factores de tipo fisiológico que influyen en la presentación de la enfermedad. Es de sobra conocida la susceptibilidad que

presentan las hembras gestantes (Luft y Remington, 1982; Siddique *et al.*, 1985; Lallemand *et al.*, 1992; Briones, 1993), y que se debe a una disminución de la inmunidad de base celular provocada por el creciente nivel de progesterona generado por la placenta (Pung *et al.*, 1985). Asimismo, hay autores (Kos *et al.*, 1984) que afirman que ratones alimentados con una dieta rica en colesterol sufren una disminución de la actividad macrofágica, y, por tanto, son más susceptibles a la enfermedad; mientras que otros (Pohjanvirta y Huttunen, 1985) mantienen que los animales sometidos a dieta parecen ser más resistentes a la infección. A pesar de esta controversia, parece innegable que determinados hábitos alimentarios contribuyen a facilitar la aparición de la enfermedad (Briones, 1993).

Otros factores relacionados con la aparición de la listeriosis han sido (Briones, 1993): las variaciones bruscas de la temperatura, aunque no existen estudios concluyentes a este respecto; el estrés, que provoca un aumento de corticoides que conlleva una disminución de la inmunidad de base celular; la existencia de heridas, principalmente en encías y zonas de cuello y cabeza; la existencia de tumores, principalmente linfomas (Schuchat *et al.*, 1991); y, la edad, no olvidemos que, aunque todas las edades son susceptibles, existe una mayor incidencia en individuos jóvenes y ancianos.

Finalmente, no queremos, dentro de esta relación de factores que tienen alguna incidencia sobre la susceptibilidad a la infección por *L. monocytogenes*, olvidar el papel del pH gástrico. En este sentido, se ha asociado el uso de cimetidina con la adquisición de la enfermedad en uno de los brotes ocurridos en Estados Unidos (Ho *et al.*, 1986). En ratas tratadas con cimetidina, parecen ser necesarias dosis de *L. monocytogenes* significativamente menores para provocar la enfermedad que las necesitadas en ratas no sometidas a este tratamiento (Schlech *et al.*, 1986, 1990). Ello demostraría el papel protector que ejerce el pH gástrico en la infección por vía oral. Aunque este factor no parece ser importante a la hora de establecer una respuesta humoral (López *et al.*, 1992).

A pesar de lo expuesto hasta el momento acerca de los factores predisponentes, existen casos que no parecen poder explicarse por los expuestos aquí, lo que hace pensar en la existencia de otros factores distintos.

| <u>Especie</u> | <u>Serovares</u> | <u>Significación patógena</u> |
|-------------------------|--|--|
| <i>L. monocytogenes</i> | 1/2a 1/2b 1/2c 3a 3b 3c 4a 4ab 4c 4d 4e 7 | Abortos, meningoencefalitis, septicemias |
| <i>L. ivannovii</i> | 5 | fundamentalmente abortos en ovejas |
| <i>L. innocua</i> | 4ab 6a 6b indeterminados | no patógenas |
| <i>L. welshimeri</i> | 6a 6b | prácticamente apatógenas |
| <i>L. seeligeri</i> | 1/2b 4c 4d 6b indeterminados | 1 caso descrito |
| <i>L. grayi</i> | | no patógenas |

Tabla 4- Significación patógena de las distintas especies y serovares de *Listeria*.

| FORMAS CLINICOPATOLOGICAS | ESPECIES |
|----------------------------------|--|
| Septicémica | Hombre, animales jóvenes de especies domésticas, roedores y lagomorfos |
| Meningítica | |
| Abortos | Hombre, rumiantes y roedores |
| Romboencefálica | Hombre y rumiantes |
| Miocárdica (postsepticémica) | Aves domésticas |
| Cutánea | Hombre |
| Queratoconjuntival | Hombre, rumiantes, roedores y lagomorfos |
| Mastitis | Vaca |
| Endocarditis | Hombre |

Tabla 5- Principales cuadros clínicos de la listeriosis (tomado de Domingo et al., 1993)

1.VII- FORMAS CLINICAS

Como hemos expuesto ya anteriormente, el número de personas y animales que pueden ser infectados por *L. monocytogenes* es muy elevado, aunque en la mayoría de ellos no se desarrollará la enfermedad. Sin embargo, en los casos en que sí lo hacen, la listeriosis puede presentar una gran diversidad de cuadros clínicos, tanto en el hombre como en los animales, aunque los más frecuentes son las formas meningíticas o encefalíticas, materno-fetales y septicémicas (tablas 4 y 5), que estudiaremos brevemente en este apartado.

1.VII.a- MENINGITIS Y ENCEFALITIS

Es la forma más frecuente en los animales domésticos, entre los que afecta principalmente a los pequeños rumiantes, en los que cursa como encefalitis; pero también lo es en las personas adultas y en individuos inmunocomprometidos, en las que cursa como meningitis (Farber y Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1993). Las manifestaciones clínicas se corresponden con las de una meningoencefalitis con afectación del romboencéfalo, tallo cerebral y médula oblonga. Esto se traduce en la aparición de opistótonos, ceguera, nistagmo, parálisis facial, ptosis parpebral, sialorrea, y el típico andar en círculos que le dio nombre a la enfermedad en el ganado ovino: "circling disease". Esto último se produce al afectarse los núcleos facial y vestibulococlear (Briones, 1990). En las personas adultas, esta forma suele estar asociada con una alta mortalidad (Farber y Peterkin, 1991), entre el 13 y el 34% durante el año 1989 en todo el mundo.

Según ha sido señalado por investigadores de nuestro grupo de trabajo (Prats *et al.*, 1992a, 1992b), una de las vías de producción de meningitis sería la llegada de las listerias al sistema nervioso central a partir de monocitos infectados que ingresan en él a través de los plexos coroideos. De esta forma se produce una inflamación de los mismos que acaba desembocando en meningitis.

En la oveja y cabra esta forma de listeriosis puede ser extremadamente grave, pudiendo producir la muerte del animal entre las 4 y 48 horas siguientes a la aparición de los primeros signos. En el caso de la vaca, sin embargo, el cuadro es menos agudo, sobreviviendo y reponiéndose la mayoría de los animales tras 4-14 días de la aparición de los primeros

síntomas. La recuperación espontánea es relativamente frecuente (Gitter, 1985; Dijkstra, 1987).

En el caso del hombre, y aunque puede darse en niños, en cuyo caso tiene un desenlace fatal, tiene una aparición predominante en adultos. Normalmente comienza con un cuadro pseudo-gripal y se continúa con cefaleas, artralgias, conjuntivitis, rinitis, fiebre, rigidez crecienta del cuello, náuseas, vómitos y fotofobia (Farber y Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991). Esta fase de excitación no suele durar más de unos 10 días, y se continúa con una somnolencia que se incrementa hasta llegar al coma con episodios convulsivos; en este estado se produce la muerte tras 2-3 días desde su aparición si no se instaura el tratamiento adecuado, que consiste en ampicilina (sola o en combinación con un aminoglucósido), penicilina G, y más recientemente cotrimoxazol (Carvajal *et al.*, 1989). En sangre circulante se detecta una marcada leucocitosis con predominancia de granulocitos, mientras que en líquido céfalo-raquídeo se aprecia presión elevada, valores de glucosa muy bajos, turbidez e incluso aspecto purulento. La aparición de monocitos en LCR es indicativo de una meningitis producida por *L. monocytogenes*. En este caso es posible el aislamiento a partir de éste (Seeliger, 1961; Emile y Bazin, 1975; Ralovich, 1984a; Domingo *et al.*, 1986; Allerberger y Guggenbichler, 1989; Ortel, 1989b; Carvajal *et al.*, 1989).

1.VII.b- INFECCION MATERNO-FETAL

Esta forma no es sino una consecuencia de una infección materna que acaba provocando aborto o septicemia perinatal (Schuchat *et al.*, 1991), aunque la infección de la madre no implica necesariamente la infección del feto (Farber y Peterkin, 1991). Fundamentalmente se presenta en oveja, vaca y la mujer. En esta última puede cursar de forma inaparente o bien producir un cuadro inespecífico con cefalea, fiebre, en ocasiones, faringitis y pielitis, e incluso síntomas gastrointestinales (Schuchat *et al.*, 1991). Este cuadro pseudogripal (Farber y Peterkin, 1991) coincide con la bacteriemia (Briones, 1990; Domingo *et al.*, 1993), y durante el mismo pueden aislarse listerias de sangre, loquios, mucus vaginal, orina y tejido de placenta (Briones, 1990). El endometrio gestante se infecta por vía hematogena, pasando la infección a placenta de forma muy rápida (Domingo *et al.*, 1993). A la fase de bacteriemia le sigue un período en el cual las listerias se encuentran en el líquido amniótico, de donde es aspirado por el feto, provocando la implicación de los tractos

digestivo y respiratorio de éste en los que se desarrollan lesiones apreciables en la necropsia (Briones, 1990). También es factible que la diseminación orgánica y aparición de *Listeria* en los distintos tejidos sea consecuencia de la bacteriemia (Seeliger, 1961). Tras la infección del feto, éste muere produciéndose el aborto, lo más frecuente en vaca y oveja, o si llega a término el neonato muere rápidamente debido a una septicemia (Domingo *et al.*, 1993).

Este cuadro septicémico del neonato cursa con disnea, cianosis, vómitos, adipsia, etc. (Lorber, 1990; Farber y Peterkin, 1991), siendo más propio de la especie humana. En los rumiantes el cuadro es más atenuado, pasando prácticamente desapercibido (Dijkstra, 1987). En el hombre se produce una marcada leucocitosis con aparición de células rojas y blancas inmaduras, y, en algunos individuos, pueden apreciarse pequeños granulomas cutáneos, llamados listeriomias, que constituyen la denominada "granulomatosis infantiséptica" (Ralovich, 1984a; Gitter, 1985; Schuchat *et al.*, 1991; Farber y Peterkin, 1991). En algunos casos, fundamentalmente en el hombre, el recién nacido puede desarrollar un cuadro tardío, de aparición entre varios días y varias semanas posteriores al parto de tipo meningítico (Schuchat *et al.*, 1991; Farber y Peterkin, 1991), que puede estar acompañado de trastornos gastrointestinales, conjuntivitis y neumonía. Esta forma clínica suele estar asociada con infecciones hospitalarias de tipo nosocomial, aunque también se ha demostrado la existencia de contagio en el momento del parto (McLauchlin, 1987; Lorber, 1990; Farber y Peterkin, 1991). Tras el parto o aborto la hembra puede seguir portando *Listeria* en su tracto genital o eliminarlas por heces durante un tiempo variable, lo que es relativamente frecuente en los rumiantes (Gray y Killinger, 1966; Clegg, 1975; Larsson, 1979; Gitter, 1979; Dijkstra, 1987; Goulet *et al.*, 1989; Marth, 1988a).

1.VII.c- INFECCIONES SEPTICEMICAS

Los individuos adultos también pueden verse afectados por una forma septicémica. Esta forma incluye aproximadamente al 25 % de los casos (Lorber, 1990). Normalmente sólo son afectados por esta forma los individuos adultos cuando sufren algún tipo de inmunodepresión; por este motivo, es una grave complicación de cualquier cuadro patológico que produzca algún grado de inmunodepresión (linfomas, enfermedad de Hodgkin, diabetes, alcoholismo, lupus eritematoso, SIDA, etc.) (Ortel, 1989a; Carvajal *et al.*, 1989; Gómez Mampaso, 1993), así como de pacientes sometidos a tratamiento inmunomodulador

(trasplantados, quimioterapia, radioterapia) (Gómez Mampaso, 1993).

Desde el punto de vista anatómo-patológico, este cuadro afecta a numerosos órganos, en los que provoca la aparición de nódulos de distintos tamaños. En cualquier caso, el hígado es el órgano diana por excelencia, y en él se desarrollan numerosos granulomas; otros órganos que también pueden verse afectados son el bazo, glándulas adrenales, pulmón, esófago, pared faríngea, tonsilas, nódulos linfáticos, timo, médula ósea, miocardio, testículos y músculos esqueléticos. La localización de estos granulomas en tejidos epiteliales puede originar la aparición de áreas necróticas en éstos.

Esta forma es muy infrecuentemente observada en los animales domésticos (Hird y Genigeorgis, 1990).

1.VII.d- OTRAS FORMAS CLINICAS

Existen un buen número de formas clínicas, de menor importancia en cuanto a su frecuencia, como son las infecciones mixtas en las que concurren otras infecciones con la listeriosis, aunque no se conocen por el momento las circunstancias en las que se produce esta concurrencia (Gitter, 1985). A consecuencia generalmente de un cuadro septicémico puede desarrollarse una neumonía y endocarditis aguda o subaguda, lo que podríamos describir como listeriosis neumónica, y que suele constituir una grave complicación (Marth, 1988a; Schuchat *et al.*, 1991). Los pacientes afectados por una listeriosis septicémica suelen desarrollar con frecuencia endocarditis y un cuadro de hepatitis (Armstrong, 1985). Las infecciones focales pueden traducirse en artritis, osteomielitis y abscesos espinales o cerebrales (Schuchat *et al.*, 1991).

Sin embargo, podríamos decir que las más importantes de entre todas ellas son las que brevemente describiremos a continuación.

- Queratoconjuntivitis: En humanos suele ser frecuente como una secuela de la forma septicémica, aunque también puede aparecer aisladamente pudiendo llegar a provocar el cuadro meningítico debido a una diseminación nerviosa centrípeta (Ortel, 1989a). En los bóvidos es relativamente frecuente la aparición de *Listeria* asociada a otros

microorganismos como *Mycoplasma bovoculi*, *Moraxella bovis*, etc, más que como único agente responsable del cuadro (Gitter, 1985).

- Listeriosis cutánea: es una forma muy rara en los animales. Suele aparecer en ganaderos y veterinarios que han tenido contacto con tejidos infectados. Las lesiones que pueden observarse son nódulos cutáneos que devienen en pústulas, de cuyo líquido puede aislarse *L. monocytogenes* (Cain y McCann, 1986). Estas lesiones cutáneas podrían ser causa de la aparición de portadores fecales, tras una fase de bacteriemia, colonización hepática y posterior excreción biliar (Briones *et al.*, 1992).

- Mastitis: Debido a la ubicuidad de *Listeria* sería de esperar que este cuadro fuese más frecuente de lo que es en realidad. Es un cuadro que carece de especial relevancia desde el punto de vista clínico, sin embargo desde el punto de vista epidemiológico y de Salud Pública sí que tiene una mayor importancia, ya que sería el responsable de una contaminación endógena de la leche por *L. monocytogenes*. En esta línea Gitter (1985) consiguió demostrar la presencia de *Listeria* en leche de vacas varios meses después de haber desaparecido la sintomatología. Sin embargo, el principal riesgo, más que los animales que llegan a desarrollar sintomatología clínica, lo constituirían aquellos que padecen una mastitis subclínica, al ser difícil su detección porque se ha de demostrar la presencia de un elevado número de leucocitos en la leche, o bien aislarse *L. monocytogenes* en cantidades de aproximadamente 10^3 UFC/ml (Errebo-Larsen y Jensen, 1979; Dijkstra, 1987; Bryner *et al.*, 1989). Sin embargo, en la actualidad se han puesto a punto medios lo suficientemente selectivos como para poder llegar a detectar la presencia de hasta 10^1 UFC *Listeria* /ml (Blanco *et al.*, 1989).

1.VIII- DEFICIENCIAS NUTRICIONALES Y ENFERMEDAD

Los seres vivos necesitan ingerir una serie de sustancias para poder mantener sus funciones biológicas en perfecto estado. Estas sustancias son, de forma general, agua, prótidos, lípidos, glúcidos, vitaminas y elementos minerales. La ingestión insuficiente de algunos de estos principios podría producir un estado carencial que puede provocar algún estado patológico per se, o bien puede facilitar la instauración de éste. Sin embargo, además

de la ingestión insuficiente hemos de tener en cuenta que, en ocasiones, a pesar de haber una cantidad óptima en la dieta de estos elementos, la existencia de circunstancias que alteran su normal absorción puede conllevar los mismos efectos que si no lo estuviesen; entre estas alteraciones cabe citar alteraciones dentarias, del tubo digestivo y glándulas anejas (Blood *et al.*, 1986).

Otros factores que pueden provocar la aparición de deficiencias nutricionales en un individuo es la existencia de sustancias que destruyan determinados elementos absorbidos o sus metabolitos, o bien que impidan a alguno de ellos realizar sus funciones; cualquier alteración en el transporte de metabolitos tiene también el mismo efecto; y, por último, la falta de apetito o anorexia, bien sea patológica o voluntaria, produce también los mismos efectos (Blood *et al.*, 1986).

La resistencia frente a las enfermedades se halla íntimamente relacionada con la ingesta del individuo, relación que se ha visto confirmada por estudios epidemiológicos llevados a cabo, principalmente, en el Tercer Mundo, aunque no debemos olvidar que las deficiencias nutricionales no son raras en los países desarrollados, en los que es relativamente frecuente encontrar estados de ligeras deficiencias. Por ejemplo en Norteamérica existe deficiencia de hierro en al menos un 9% de la población. En casos de malnutrición proteica y energética pueden aparecer alteraciones de la respuesta inmune, que, además, pueden aparecer en casos de deficiencias de un único elemento (Chandra, 1985, 1989).

Sin embargo, existen pocos datos sobre la significación económica y la incidencia de estos problemas a los que poder referirnos. La mayoría de los trabajos publicados sobre las enfermedades carenciales más conocidas no dan en su mayoría datos cuantitativos que permitan conocer su verdadera incidencia así como su impacto económico real. A pesar de estas deficiencias informativas, el libro de Sanidad Animal de la FAO/OMS (citado por Blood *et al.*, 1986) revela que una gran mayoría de los casos en los que se pudo identificar las causas fueron debidas a problemas nutricionales, bien deficiencias o bien excesos.

Otro problema sobreañadido a la hora de valorar la importancia económica de estos procesos se encuentra en que muchas veces la deficiencia nutricional provoca un mayor susceptibilidad a otras enfermedades que son a las que se achacan esas pérdidas. Como

ejemplo digamos que en el Reino Unido, a pesar de la política de suplementar las dietas, aparecen signos de deficiencia en cobre anualmente en el 0,9% de la población vacuna, pero las pérdidas debidas a esta deficiencia podrían estar muy infravaloradas debido a una mayor susceptibilidad de los animales deficientes en cobre a las enfermedades infecciosas (Blood *et al.*, 1986).

Podemos afirmar, por tanto, que las deficiencias minerales se encuentran ampliamente distribuidas, pero el conocimiento de su incidencia e importancia real se encuentra infravalorado debido a que las formas subclínicas de deficiencia suelen pasar desapercibidas.

En los países desarrollados las deficiencias de los oligoelementos suelen confundirse con otras carencias más comunes como son las deficiencias energéticas, proteicas, de fósforo y agua que afectan al desarrollo postnatal y a la función reproductora. De forma general, se considera a la malnutrición como la causa más frecuente de inmunodeficiencia secundaria en el mundo. Podemos afirmar que la malnutrición provoca alteraciones en los tejidos linfoides, que presentan un menor desarrollo que en condiciones normales. Son numerosos los factores involucrados en este menor desarrollo, pero podemos citar, entre otros, un descenso en la síntesis proteica y, por tanto, en la proliferación celular, así como un aumento de los fenómenos de citolisis debido a un aumento de los niveles de glucocorticoides (Chandra, 1985).

Por otra parte, las deficiencias minerales y los desequilibrios en el suelo y forrajes han sido factores admitidos como causas de baja producción y problemas reproductivos. De hecho, el ganado de zonas con bajas cantidades de cobre, cobalto y fósforo en los terrenos se encuentran más limitados incluso por la falta de estos elementos que por deficiencias de energía o proteínas (Blood *et al.*, 1986).

De forma general podemos afirmar que los elementos esenciales para los seres vivos son 15, que pueden dividirse en dos grandes grupos:

- a) macronutrientes: calcio, cloro, fósforo, sodio, potasio, magnesio y azufre;
- b) micronutrientes: cobre, selenio, zinc, cobalto, hierro, yodo, manganeso y molibdeno.

Estos micronutrientes o elementos traza se encuentran involucrados como componentes de muchos tejidos y algunos son indispensables para el correcto funcionamiento de una o más enzimas. Su carencia conduciría a una amplia serie de consecuencias patológicas y defectos metabólicos (Blood *et al.*, 1986).

La susceptibilidad a enfermedades podría encontrarse influida por el estado de desarrollo fisiológico, diferencias genéticas e interrelaciones con otros elementos; por tanto, dos animales con niveles parecidos de un elemento no tendrían por qué responder igual (Blood *et al.*, 1986).

Una deficiencia nutricional no implica la aparición de enfermedad, existen factores que predisponen el individuo para su aparición como la edad a la que aparece la deficiencia, determinados cambios en el medio ambiente, el contacto con determinados agentes infecciosos y/o parasitarios, la respuesta individual a la deficiencia, la posibilidad de utilizar rutas alternativas por parte del organismo, y la existencia y tamaño de reservas de ese elemento (Blood *et al.*, 1986).

Los tres principios que deberían presidir la interpretación de los criterios bioquímicos acerca del estado de los elementos minerales son:

- 1- su relación con la ingesta;
- 2- tiempo que dura la deficiencia; y,
- 3- función del elemento deficiente.

Cuando un elemento desaparece de la dieta, se produce un aporte del mineral a partir de los distintos compartimentos del organismo, lo que permite que durante algún tiempo los niveles sanguíneos del mineral en cuestión no varíen. Sin embargo, si la deficiencia persiste, los mecanismos encargados de mantener la homeostasis en el organismo no pueden mantener esos niveles plasmáticos; así se llega a un momento en el cual la actividad de la(s) enzima(s) que necesitan a ese mineral comienza a disminuir, apareciendo una fase de disfunción. Esta fase, de duración variable, suele coincidir con el período subclínico de la deficiencia, pero si finalmente la carencia mineral en la dieta no se recupera, aparecen una serie de cambios celulares responsables de las manifestaciones clínicas (Blood *et al.*, 1986).

1.IX- IMPORTANCIA BIOLOGICA DEL SELENIO

1.IX.a- ACCIONES BIOLOGICAS. ENZIMAS.

La importancia en los seres vivos de este elemento fue debida en un principio a sus efectos tóxicos (Spallholz *et al.*, 1990; Turner y Finch, 1991). En este sentido, estos últimos autores afirman que de los escritos de Marco Polo puede inferirse que algunos mercaderes en viaje hacia el Lejano Oriente pudieran perder sus bestias de carga debido al uso como forraje de hierba con altos contenidos en selenio.

Durante muchos años predominó su consideración como tóxico (Gyang *et al.*, 1984; Spallholz *et al.*, 1990; Bedwal *et al.*, 1993), hasta que en 1957 Schwarz (citado por Backall y Scholz, 1979; Gyang *et al.*, 1984; Miller, 1985; Spallholz *et al.*, 1990; Turner y Finch, 1991; Zachara *et al.*, 1993) publica los resultados sobre sus investigaciones acerca de la degeneración hepática nutricional en la rata y la influencia de una dieta pobre en vitamina E. En éstos afirma que el llamado "Factor 3" aislado de hígado porcino prevenía esta enfermedad. Este "Factor 3" contenía en su composición selenio, y poco tiempo después se demostró que este elemento era capaz de prevenir la degeneración hepática nutricional en la rata. Desde ese momento se le reconocía su papel como un nutriente esencial para el organismo.

A partir de este hecho los descubrimientos relacionados con el selenio se multiplicaron (Miller, 1985; Zachara *et al.*, 1993). Especial relevancia tuvo el descubrimiento de que formaba parte esencial de la enzima glutation-peroxidasa (GSHPx), llevado a cabo en 1973 por John Rotruck (citado por Backall y Scholz, 1979; Miller, 1985; Spallholz *et al.* 1990; Turner y Finch 1991). Esta enzima, junto con la vitamina E, forma parte de los sistemas de detoxicación de determinados metabolitos activos de oxígeno que se producen durante numerosas funciones metabólicas de las células (Fig. 3). El fallo de estos sistemas causa un daño celular e incluso la muerte celular (Rotruck, 1972; Morris, 1984; citados por Boyne y Arthur, 1990).

La glutation-peroxidasa no es la única enzima dependiente de selenio en los animales superiores. En 1985 Ursini (Spallholz *et al.*, 1990) describe la existencia de una enzima de

peso molecular inferior a la primera (20.000 y 84.000 respectivamente), la fosfolipidihidroperóxido glutathion peroxidasa (PLGSHPx). Esta enzima parece tener las mismas acciones que la anterior, además de intervenir en la reducción de los fosfolipidihidroperóxidos. El selenio es también un componente de otras proteínas como son la selenoproteína del músculo, la selenoflagelina, las proteínas transportadoras de selenio y las enzimas bacterianas formato-dehidrogenasa y glicina-reductasa (Koller y Exon, 1986). Asimismo, el selenio participa en el metabolismo de numerosas drogas y xenobióticos; por ejemplo, el selenio contrarresta la toxicidad de determinados metales pesados como el arsénico, cadmio, mercurio, cobre, plata y plomo (Hill, 1975; Koller y Exon, 1986).

El papel bioquímico esencial del selenio se debe, pues, a que forma parte de la enzima glutathion-peroxidasa (GSHPx) (Braun *et al.*, 1991; Bedwal *et al.*, 1993). La actividad de esta enzima en los eritrocitos ha sido directamente relacionada con la concentración hemática de selenio en vacuno, ovejas, caballos pollos, ratas y cerdos (Backall y Scholz, 1979), y es un dato muy útil tanto el diagnóstico de la deficiencia en selenio, existiendo una relación directa entre los niveles de GSHPx y tasa de selenio en sangre y tejidos de estos animales (Backall y Scholz, 1979). Esta enzima contiene 4 moles de selenio como selenocisteína en su región activa (Bedwal *et al.*, 1993).

La glutathion peroxidasa protege la fracción lipídica de las membranas celulares y orgánulos del daño por peroxidación mediante inhibición y destrucción de los peróxidos endógenos, actuando en conjunción con la vitamina E para mantener la integridad de estas membranas (Backall y Scholz, 1979; Koller y Exon, 1986). El peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos producen la desnaturalización irreversible de proteínas esenciales de la célula lo que conduciría a la degeneración y necrosis, por alteración de las membranas biológicas, e incluso, a la destrucción del tejido conectivo (Braun *et al.*, 1991). La GSHPx cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno y determinados hidroperóxidos orgánicos producidos por el glutathion durante el ciclo redox (Koller y Exon, 1986) (Fig. 4). Esta dependencia de la actividad GSHPx con la presencia de selenio explica la interrelación entre selenio, vitamina E y los aminoácidos sulfurados en los animales. Estos aminoácidos pueden actuar como precursores del glutathion que, a su vez, actuaría como substrato de GSHPx y mantiene los grupos sulfidrilos de la célula.

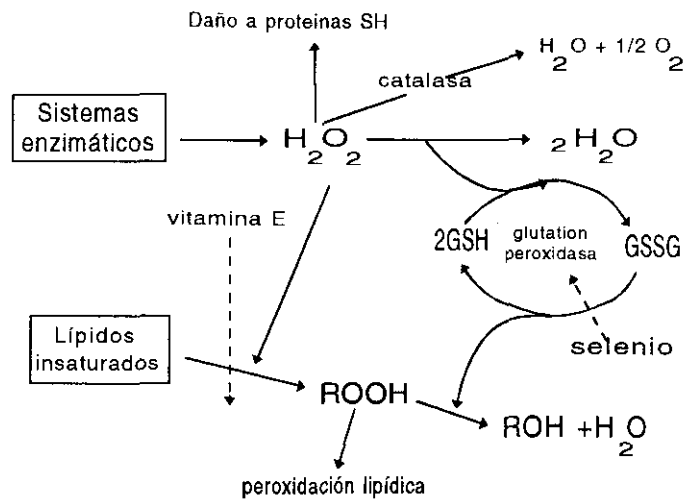


Figura 3- Acción de la GSHPx y de la vitamina E en el metabolismo celular.

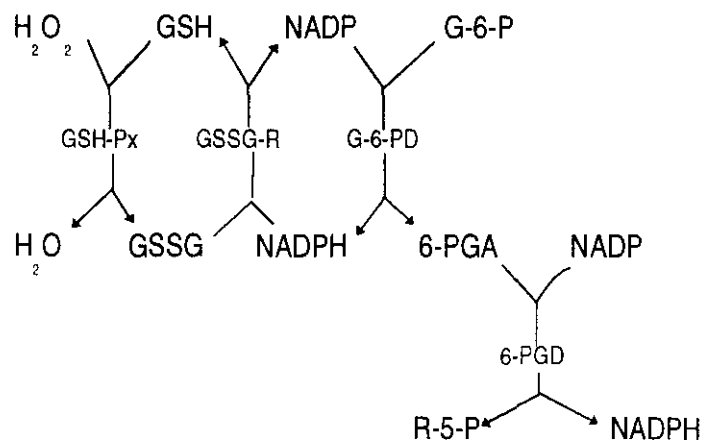


Figura 4- Acción de la GSHPx en el ciclo redox.

El papel bioquímico de la vitamina E es el de actuar como un antioxidante, previniendo el daño oxidativo de los lípidos sensibles de las membranas celulares al disminuir la formación de hidroperóxidos (Braun *et al.*, 1991). Esta vitamina presenta un papel importante en la protección de las membranas celulares del daño por lipoperoxidación (Turner y Finch, 1991; Braun *et al.*, 1991).

Existe una importante interrelación entre selenio, vitamina E y los aminoácidos sulfurados en la prevención de algunas de las enfermedades nutricionales causadas por su deficiencia. Si la vitamina E previene la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos, y los aminoácidos sulfurados (como precursores de la GSHPx) y el selenio se hallan involucrados en la destrucción de los peróxidos, estos nutrientes podrían producir un efecto bioquímico muy similar, reduciendo la concentración tanto de peróxidos como de compuestos inducidos por éstos en los tejidos (Blood *et al.*, 1986). La protección frente al daño oxidativo de las proteínas no de membrana susceptibles, por el selenio de la dieta, pero no por la vitamina E, podría explicar por qué algunas enfermedades nutricionales responden al selenio, pero no a la vitamina E. Por otro lado, determinados tejidos o componentes a nivel subcelular podrían no estar correctamente protegidos debido a que presentan de forma inherente menores cantidades de GSHPx, incluso con dietas adecuadas. El daño producido a estos tejidos se vería agravado por dietas con alto contenido en ácidos grasos insaturados, siendo de esperar que respondieran positivamente a la administración de vitamina E, pero no a la de selenio. Las variaciones en la actividad de GSHPx entre determinados órganos como hígado, corazón y músculos esquelético y cardíaco podrían explicar las variaciones en la gravedad de las lesiones entre especies.

1.IX.b- TOXICIDAD DEL SELENIO

Como ya hemos reseñado anteriormente, el selenio fue conocido antes por sus efectos tóxicos que por ser un nutriente esencial (Gyang *et al.*, 1984; Spallholz *et al.*, 1990). Los efectos tóxicos en los animales están asociados a lugares con una alta concentración de selenio en el suelo. Podemos distinguir un efecto agudo, con sintomatología principalmente nerviosa, y un efecto crónico, caracterizado por emaciación, miopatías y alopecias (Blood *et al.*, 1986; Koller y Exon, 1986).

La selenotoxicosis está ligada a la existencia de una serie de plantas acumuladoras de este elemento. La existencia de estas plantas, pertenecientes a los géneros *Astragalus* y *Oxytropis*, deben alertarnos sobre la probable aparición de esta patología. Son plantas que no suelen crecer en suelos con bajos contenidos en selenio, y, además, tienen la relativa ventaja de no ser excesivamente atractivas para el ganado debido a su fuerte olor (Blood *et al.*, 1986; Bedwal *et al.*, 1993).

Otras vías de intoxicación por selenio las constituirían la ingestión de residuos industriales, así como una posible vía yatrogénica por la costumbre actual de inyectar selenio a los animales para prevenir enfermedades como la distrofia muscular enzootica (Blood *et al.*, 1986; Bedwal *et al.*, 1993).

Independientemente de la vía de entrada del exceso de selenio en el organismo, el mecanismo de su efecto tóxico se debe a que es incorporado en los aminoácidos sulfurados en lugar de azufre, y por tanto interfiere en los complejos enzimáticos en los que intervienen estos aminoácidos (Bedwal *et al.*, 1993). El selenio reduce, además, las concentraciones hepáticas de azufre y proteínas en ovejas; en este sentido, dietas con alta concentración proteica poseen un efecto protector frente a esta intoxicación (Blood *et al.*, 1986).

En las intoxicaciones agudas suelen aparecer halitosis alícea, diarrea acuosa, fiebre, taquicardia, posturas anormales, postración y muerte de los individuos afectados por fallo respiratorio (Koller y Exon, 1986; Bedwal *et al.*, 1993). Por su parte, la forma crónica cursa con adinamia, emaciación, pérdida de vitalidad, rigidez y cojeras. Otro síntoma de la intoxicación crónica es la alopecia parcial o total que puede aparecer. Las lesiones más frecuentes son congestión hepática y renal, con aparición de focos necróticos en hígado, endocarditis, miocarditis y hemorragias epicárdicas (Blood *et al.*, 1986; Koller y Exon, 1986; Bedwal *et al.*, 1993).

Aunque el selenio puede detectarse tanto en sangre como en leche y pelo de los animales afectados, no hemos encontrado demasiados datos sobre estos últimos parámetros. Sin embargo, niveles sanguíneos de 3 ppm de selenio suponen la aparición de enfermedad clínica. Por otra parte, también puede encontrarse una leve anemia tanto en los casos agudos como crónicos; en este sentido, valores de hemoglobina próximos a 7 g/dl suelen aparecer

asociados a esta intoxicación.

En lo que respecta al hombre, las cantidades necesarias para producir intoxicación han sido durante muchos años objeto de debate (Koller y Exon, 1986). Así, existen datos contradictorios como son que en zonas donde se ingieren cantidades de 4,99 mg/día la selenosis es endémica, y por otra parte se han realizado estudios donde se han llegado a ingerir 1,510 mg/día sin que aparecieran signos de la intoxicación (Koller y Exon, 1986), e incluso existen datos sobre un hombre de 62 años que tomó 1 mg de selenio en forma de selenito sódico durante dos años antes de que aparecieran ligeros síntomas de intoxicación (Koller y Exon, 1986).

En cualquier caso, los síntomas de la intoxicación por selenio en el hombre son halitosis aliácea, engrosamiento y fragilidad de las uñas con aparición de puntos blancos o líneas longitudinales, pelo seco y frágil que se rompe con facilidad, enrojecimiento e inflamación de la piel en la que pueden formarse ampollas o incluso úlceras, y alteraciones de tipo nervioso como convulsiones y parálisis (Koller y Exon, 1986; Bedwal *et al.*, 1993). La aparición de estos signos depende de la intensidad de la selenosis.

1.IX.c- DEFICIENCIA EN SELENIO

Debido a que es más fácil que se produzca esta alteración, se conocen mejor las alteraciones de los animales domésticos debidas o, al menos asociadas, a una deficiencia de selenio y/o vitamina E. Normalmente estas manifestaciones suelen estar asociadas con determinados factores predisponentes o desencadenantes, como por ejemplo consumo de ácidos grasos insaturados con la dieta, ejercicio inhabitual y crecimiento demasiado rápido en los animales jóvenes (Blood *et al.*, 1986). Estas enfermedades suelen agruparse bajo el epígrafe de "enfermedades asociadas a carencias de selenio-vitamina E", puesto que en su mayoría pueden ser prevenidas mediante una correcta administración de uno o ambos elementos en la dieta (Blood *et al.*, 1986).

Como se dijo, un correcto aporte de selenio-vitamina E es importante y su deficiencia puede provocar diversas alteraciones (Braun *et al.*, 1991) de entre las que podríamos citar las siguientes (Blood *et al.*, 1986; Koller y Exon, 1986; Hassan *et al.*, 1990), aunque para su

estudio más detallado debamos remitirnos a un tratado de patología:

1- distrofias musculares: son, probablemente, los problemas patológicos más conocidos debidos a las deficiencias en selenio/vitamina E en la dieta. Pueden afectar a distintas especies, y tanto a los músculos cardíacos como a los esqueléticos. En algunos casos pueden producir parálisis por lesiones simétricas de la espina dorsal. La más conocida, con casi toda seguridad, es la "enfermedad del músculo blanco" en los rumiantes;

2- hepatosis dietética: esta forma suele aparecer en cebaderos de cría intensiva de ganado porcino, en los que se utilizan piensos con escasas concentraciones en estos elementos;

3- alteraciones de la respuesta inmune: esta es la alteración de más reciente conocimiento. Será tratado con cierta profundidad en el siguiente capítulo; y,

4- otras alteraciones: problemas en la reproducción, retención de membranas fetales y mayor fragilidad eritrocitaria.

Estas alteraciones están causadas por dietas deficientes en selenio o selenio-vitamina E, junto con la posible presencia de factores condicionantes, como una excesiva cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta. Prácticamente la totalidad de estas enfermedades que aparecen de forma natural han podido ser reproducidas de forma experimental usando dietas deficientes en selenio y/o vitamina E; y a la inversa, las lesiones pueden ser prevenidas mediante la suplementación con selenio y vitamina E (Blood *et al.*, 1986). En determinadas circunstancias se ha podido comprobar que la incorporación de cantidades excesivas de ácidos grasos poliinsaturados ha resultado ser un factor importante en la enfermedad experimental. Parece que la presencia de estos ácidos grasos en la dieta causaría una deficiencia en vitamina E, por la actuación antioxidante de ésta.

Pueden existir interacciones entre el selenio y otros elementos traza (Blood *et al.*, 1986; Van Vleet *et al.*, 1977, 1981; Hill, 1975). Las lesiones debidas a las deficiencias en selenio y vitamina E pueden ser reproducidas en lechones y patos alimentados con cantidades excesivas de cobalto, plata, telurio, zinc y vanadio (Van Vleet *et al.*, 1981). La suplementación

con selenio-vitamina E puede conferir protección frente a la cardiomiopatía inducida por cobalto (Van Vleet *et al.*, 1977).

En el hombre, una deficiencia en selenio también produce alteraciones, siendo la más importante la enfermedad de Keshan (Koller y Exon, 1986; Bedwal *et al.*, 1993). Esta enfermedad es una cardiomiopatía que puede acabar con la vida del enfermo, pero que responde bien a la terapia con selenio. De forma general, cursa con alteraciones musculares, así como aumento de las actividades GOT, GPT y CK en sangre. Este mismo autor, basándose en estudios epidemiológicos, afirma que la deficiencia en selenio es un factor a tener en cuenta en las enfermedades cardiovasculares del hombre, ya que parece que la incidencia de hipertensión es más alta en zonas con deficiencia en selenio que en las que su concentración es la adecuada (Koller y Exon, 1986). Por otra parte, igual que parece ocurrir en los animales, la deficiencia en selenio no se expresa a no ser que exista algún factor predisponente o desencadenante, como el estrés (Koller y Exon, 1986), y debe ser tomada en cuenta en caso de SIDA, síndrome de Down y enfermedad de Crohn (Bedwal *et al.*, 1993).

Los datos disponibles hasta el momento, sugieren que tanto el selenio de la dieta, como los aminoácidos sulfurados y la vitamina E actuarían de forma sinérgica protegiendo los tejidos de un daño oxidativo. Es evidente que la GSHPx, que depende del selenio de la dieta, juega un papel importante en la detoxicación de los peróxidos lipídicos reduciéndolos a compuestos hidroxilo de los ácidos grasos no tóxicos, mientras que la vitamina E prevendría de la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos. La presencia de altos niveles de ácidos grasos insaturados en la dieta, aumentaría los requerimientos de vitamina E, produciéndose la oxidación tisular con la consiguiente degeneración y necrosis tisular, sobre todo en los casos en que coexista un escaso aporte de selenio con la dieta.

1.IX.d- SELENIO Y SISTEMA INMUNE

Este apartado de las funciones biológicas del selenio es el de descripción más reciente y el que centra, en la actualidad, el grueso de las investigaciones, hasta el punto de que Spallholz *et al.* (1990) llega a citar 82 referencias acerca del papel del selenio en la inmunidad entre 1972 y 1989. Todos los autores parecen estar de acuerdo en que la suplementación de la dieta con selenio tiene efectos beneficiosos sobre la respuesta inmune,

y que, por el contrario, la deficiencia de este elemento provoca alteraciones en ésta (Koller y Exon, 1986; Spallholz *et al.*, 1990; Turner y Finch, 1991)

La primera referencia de que el selenio jugaba algún papel en la respuesta inmune data del año 1959 (Spallholz *et al.*, 1990) cuando McConnell observa como el ^{75}Se inoculado subcutáneamente en perros era incorporado en la fracción proteica de sus linfocitos. A éste le siguieron varios descubrimientos en este sentido, entre los que podemos citar (Spallholz *et al.*, 1990) la descripción por primera vez del efecto antiinflamatorio de una fracción, que posteriormente se vio estaba formada por selenio; el hallazgo de la GSHPx en los leucocitos humanos; y, la disminución de la actividad de esta enzima en mujeres con la enfermedad crónica granulomatosa.

Sin embargo, la primera referencia específica acerca de selenio y respuesta inmune, se produce en 1972 (Spallholz *et al.*, 1990) cuando Berenshtein observa cómo la producción de anticuerpos en conejos inoculados con toxina diftérica fue mayor tras una segunda o, incluso, una tercera inoculación en los animales tratados con selenito sódico que en los respectivos controles no tratados. A partir de este descubrimiento los trabajos que relacionan selenio y sistema inmune se han visto aumentados en gran número tal como puede verse en la excelente revisión de Spallholz *et al.* (1990). En este sentido, la disponibilidad de selenio en la dieta afecta a todos los componentes del sistema inmune (Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1992), tanto a la función de los polimorfonucleares neutrófilos, como a la proliferación linfocitaria, mecanismos de citotoxicidad y de producción de anticuerpos (Reffert Stabel *et al.*, 1989; Sordillo *et al.*, 1993) entre otros.

Dado que existe una relación directa entre la tasa de selenio y actividad de GSHPx, es preciso hacer referencia a la actuación de ésta respecto al Sistema Inmune. Se ha podido comprobar que la GSHPx se encuentra en la práctica totalidad de las células que derivan de la médula ósea, esto es, eritrocitos, linfocitos, monocitos, e incluso en las plaquetas, así como en los órganos principales del sistema inmune como médula ósea, timo, hígado, bazo, glándulas linfoides, e incluso en el intestino. No debemos olvidar que este último es uno de las principales puertas de entrada de elementos extraños al organismo.

Las funciones de esta enzima con respecto al sistema inmune son:

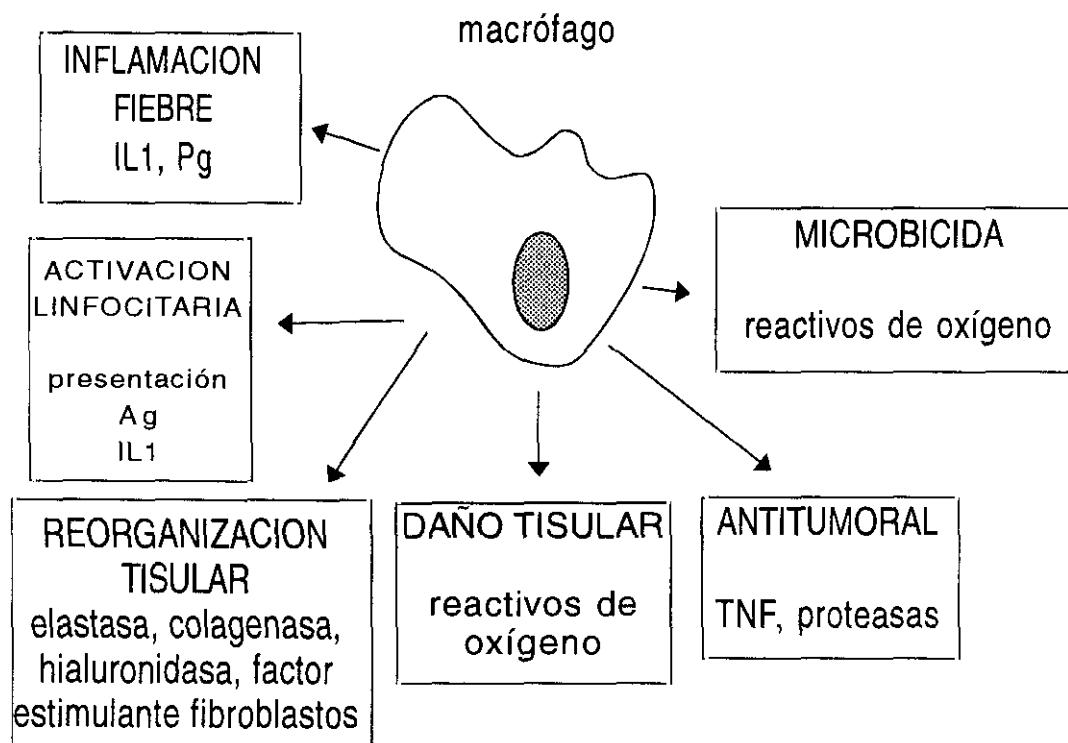
- 1- reducción de los peróxidos orgánicos e inorgánicos que se forman durante el metabolismo general;
- 2- metabolismo de los hidroperóxidos que se forman en las rutas de la lipoxigenasa y de la cicloxigenasa a partir del ácido araquidónico; y,
- 3- reducción del peróxido de hidrógeno, así como del anión O_2^- formados durante la explosión oxidativa en la fagocitosis.

1.IX.d.1- Influencia sobre la función fagocítica

Una vez llegados al foco inflamatorio o infeccioso los monocitos y macrófagos eliminan todo aquello que pueda resultar dañino al hospedador. Para ello engloban al agente extraño incluyéndolo dentro de una vacuola en su citoplasma, vacuola que es conocida como fagosoma. Las células fagocíticas presentan una gran riqueza en lisosomas en su citoplasma, orgánulos que fusionan sus membranas con las del fagosoma liberando su contenido en su interior, que pasa a denominarse fagolisosoma. De esta manera en el interior del fagolisosoma existe un ambiente ácido, rico en enzimas que destruyen ese agente extraño, pero además ese ambiente es rico en una serie de metabolitos de oxígeno (H_2O_2 y O_2^- entre otros) que facilitan esa labor tóxica del fagolisosoma (Fig. 5).

Vemos, pues, cómo existe gran cantidad de compuestos de oxígeno que actúan como antimicrobianos. Sin embargo estos productos son también tóxicos para la célula, y, por tanto, si ésta fuera incapaz de detoxicar estos productos se produciría un daño a sí misma. Entre los responsables de evitar esos daños a las membranas se encuentran tanto la GSHPx como la vitamina E. Es de destacar que en los leucocitos la actividad GSHPx es mayor que en los eritrocitos, lo que indica que esta enzima actúa también en los fenómenos de fagocitosis (Erskine *et al.*, 1987).

Una deficiencia en selenio produce una menor actividad GSHPx y un fallo en la fagocitosis de *Candida* (Erskine *et al.*, 1987; Turner y Finch, 1991), fallo que parece ser debido a una disminución en la capacidad fungicida más que a una alteración en la capacidad



**Figura 5- Resumen
del papel del
macrófago en la
respuesta inmune.**

tomado de Roitt, I.;
Brostoff, J.; Male, D.
"Immunology" (1985).
Gower Medical Publishing.
Londres.

de ingerirla (Serfass y Gauther, citado por Miller, 1985). Aunque estos mismos autores no parecen ponerse de acuerdo en cuanto a si la actividad bactericida se encontraría afectada, los primeros afirman que se encontraría disminuida ante determinadas bacterias como ocurre con *S. aureus* y neutrófilos bovinos deficientes, mientras que frente a *Proteus mirabilis* no se vería afectada. Por el contrario, Turner y Finch (1991), basándose en los trabajos de diversos autores, llegan a afirmar que la actividad bactericida podría no verse afectada en animales deficientes en selenio y vitamina E, lo que en nuestro juicio es, cuanto menos, una afirmación comprometida a la vista de la bibliografía existente sobre el tema. En cualquier caso los fallos funcionales de los neutrófilos de animales selenio deficientes podrían restaurarse mediante la administración de pequeñas cantidades de selenito sódico (citado por Turner y Finch, 1991), durante un escaso período de tiempo.

La fagocitosis produce un aumento en el consumo de O_2 que es reducido por la NADPH oxidasa a otras formas que resultan más bactericidas, pero que también resultan perjudiciales para las membranas celulares al producir la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados. La deficiencia en selenio implicaría unas cantidades menores de GSHPx, lo que influiría sobre la capacidad celular de detoxicar H_2O_2 , lo que conllevaría un aumento de los peróxidos lipídicos, que inhibirían la ruta de las hexosas monofosfato, que inhibiría, a su vez, la regeneración de la NADPH a través de esta ruta y por tanto acabaría produciendo una limitación en la capacidad bactericida de los neutrófilos (Gyang *et al.*, 1984; Erskine *et al.*, 1989). Pero además el NADPH es necesario para reducir nuevamente la glutathion peroxidasa oxidada al detoxicar los peróxidos de hidrógeno, que en esta forma oxidada es inactiva a estos efectos (Gyang *et al.*, 1984).

Por otra parte, algunos autores afirman que las rutas de la ciclooxigenasa y de la lipoxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico son selenio dependientes, y, por tanto, podrían aparecer alteraciones en la función reguladora de los macrófagos por alteración de determinados metabolitos derivados del ácido araquidónico como por ejemplo la PGE_2 , la $F_{2\alpha}$, y el leucotrieno B_4 (Erskine *et al.*, 1989; Eskew *et al.*, 1989).

1.IX.d.2- Influencia sobre la producción de anticuerpos

Existen descripciones sobre cómo el aporte de selenio extra en la dieta de ratones llega

a provocar un aumento de entre 7 y 30 veces (según cantidad suplementada) en la producción de anticuerpos (Miller, 1985). Sin embargo, estas alteraciones en la producción de anticuerpos parecen estar condicionadas por la edad del individuo (citado por Turner y Finch, 1991). Así, pollos de dos semanas mantenidos con una dieta deficiente en selenio o selenio-vitamina E mostraron títulos menores frente a eritrocitos de oveja, sin embargo, si los animales tienen una semana más, sólo los mantenidos con deficiencia en selenio-vitamina E mantuvieron esa menor producción de anticuerpos. Otros autores citados por Turner y Finch (1991) han empleado ratones y han observado que si son mantenidos con deficiencias en selenio se produce disminución de la respuesta con IgG, pero no con IgM, lo cual indicaría que lo que resulta particularmente sensible a esa deficiencia serían los linfocitos T-colaboradores. Para poder observar una disminución de la producción de la IgM se tendría que mantener esa dieta hasta la segunda generación (Turner y Finch, 1991), aunque si se utiliza una dieta deficiente en selenio-vitamina E esa producción se ve alterada con mayor rapidez (Turner y Finch, 1991).

Por otra parte, las cantidades de selenio suplementadas en la dieta que producen una mayor producción de anticuerpos, también están condicionadas a la especie del receptor, edad, sexo y naturaleza del antígeno. Por ejemplo, Turner y Finch (1991) citan que las cantidades de selenio en la dieta que producen un aumento de los títulos frente a eritrocitos de oveja en ratones jóvenes son inhibitorias en machos, pero no en hembras; asimismo, afirman que esa elevación que se observa en ratones y cerdos jóvenes no se ve en animales mayores, y que una dosis de selenito sódico en la dieta de corderos, que había dado los mejores resultados frente a la toxina tetánica, dio unos resultados muy pobres cuando el antígeno empleado fue el virus de la parainfluenza-3 o *Corynebacterium pseudotuberculosis*. En este sentido estos mismos autores afirman que una microdeficiencia en selenio no implica una menor respuesta de anticuerpos siempre que los niveles de vitamina E se mantengan normales (Turner y Finch, 1991). Otros autores (Blodgett *et al.*, 1986) afirman que el aumento en la producción de anticuerpos en animales suplementados con selenio en su dieta, se produce únicamente hasta una determinada cantidad de este elemento, que ellos cuantifican en 0,9 mg/Kg, por encima de la cual la tasa de anticuerpos descende.

Sin embargo, existen autores que afirman no haber encontrado diferencias en las tasas de anticuerpos de animales alimentados con una dieta deficiente en selenio y animales

alimentados con cantidades adecuadas de este elemento (Reffert Stabel *et al.*, 1989). Aunque estos mismos autores afirman que esto podría ser debido a que la deficiencia en selenio provocada no fuera lo suficientemente intensa para ello. Por otra parte, estos autores sí encuentran diferencias en las tasas de anticuerpos el día 17 postinfección entre animales deficientes y los controles, debido posiblemente a que los primeros tendrían una peor eliminación del patógeno (en este caso *P. haemolytica*), y, por tanto, se favorecería una mayor estimulación antigénica de los linfocitos B.

Estos mismos autores mezclan animales deficientes y no deficientes inoculados y no inoculados con *P. haemolytica*, y observan cómo los títulos de anticuerpos en los animales deficientes son superiores que los observados en los animales suplementados. Lo cual podría ser debido a que los animales deficientes presentarían mayor susceptibilidad frente a una infección bacteriana secundaria que los suplementados, o bien, a que la suplementación con selenio acaba provocando una disminución de la respuesta inmune. Esto último está de acuerdo con lo afirmado por otros autores (Murray y Murray, 1985), quienes llegan a la conclusión que la deficiencia en selenio aumenta la supervivencia de ratones frente a *Plasmodium bergii*, *Listeria monocytogenes* o frente al virus de la pseudorabia.

También Droke *et al.* (1989) menciona la posibilidad de que se produzca algún tipo de inmunosupresión en animales suplementados con selenio, ya que encuentran niveles muy bajos de seroconversión en sus experiencias con *P. haemolytica*, aunque no se extienden sobre este particular. Sí encuentran un aumento de las tasas de IgG frente a este agente aunque no aprecian mejoría en el estado sanitario de los terneros tratados, lo cual podría ser debido a las interacciones de otros agentes responsables del complejo respiratorio bovino.

1.IX.d.3- Influencia sobre la función secretora de las células del sistema inmune

Tanto los linfocitos como los macrófagos secretan una serie de sustancias que actúan como mediadores químicos de la respuesta inmune (Fig. 5). De entre éstos los más conocidos son las interleuquinas 1 y 2. Las cantidades de estas sustancias secretadas por células de animales deficientes y normales no presenta diferencias importantes (Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1990, 1992; Sordillo *et al.*, 1993), por lo que estos autores afirman que la secreción de estos mediadores no es dependiente de los niveles de selenio existentes en el organismo.

Por otra parte, parece existir un aumento en la producción de TNF- α en animales suplementados (Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1992), aunque estos autores responsabilizan del mismo al aumento de macrófagos citotóxicos en los animales suplementados. Sin embargo, no parece haber datos del efecto de la deficiencia en selenio sobre mediadores el TNF o las interleuquinas 6 y 8 (Sordillo *et al.*, 1993). Estas sustancias, con un importante papel en los fenómenos de inflamación, podrían desempeñar también funciones quimiotácticas sobre los neutrófilos, y podrían verse afectados por los niveles de selenio en el organismo. En definitiva, no parecen existir datos concluyentes y, por tanto, ésto necesita aún ser estudiado con mayor profundidad.

1.IX.d.4- Influencia sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos T y B

Una vez el antígeno es procesado por los macrófagos, se une a las moléculas de clase I ó II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad existentes en la superficie de los macrófagos y son presentados a los linfocitos T, lo cual constituye la primera señal para la activación de estas últimas células (Fig. 5). Este mismo efecto lo pueden realizar, entre otras, determinadas lectinas mitogénicas vegetales como la concavalina-A (Con-A) y la fitohemaglutinina (PHA). Sin embargo, para que se produzca la estimulación máxima es necesaria la presencia de un factor de co-estimulación como la IL1. Como respuesta a esa estimulación, una subpoblación de linfocitos T produce IL2, mientras otra subpoblación expresa receptores para esa última. Finalmente, la unión entre la IL2 y sus receptores provoca una señal para que las células que poseen estos receptores comiencen a proliferar.

Utilizando mutágenos específicos para los linfocitos T, como la concavalina A (Con A) o la fitohemaglutinina (PHA), se ha comprobado que en pollos y animales monogástricos la deficiencia en selenio provoca una menor respuesta de las células T (Turner y Finch, 1991; Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1992). Esta menor respuesta de los linfocitos T se ve mucho más disminuida si la deficiencia es en selenio y vitamina E, e incluso es más evidente en este caso que la alteración que se produce en la respuesta de los linfocitos T a causa de una menor ingesta de alimento (citado por Turner y Finch, 1991).

Como los niveles de IL1 y 2 no se ven afectados de forma diferente por una deficiencia o suplementación con selenio, y además la función presentadora de antígenos de

los macrófagos no se encuentra alterada tampoco (Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1990), esta menor respuesta puede ser achacada a las células accesorias. Estos autores (Roy *et al.*, 1992) han observado cómo, efectivamente, esta alteración de la respuesta blastogénica de los linfocitos T se debe a que la expresión de los receptores de IL2 se encuentra alterada, hasta el punto de que en caso de deficiencia esta expresión se lentifica en gran medida. Esta lentificación se debe a que en caso de deficiencia en selenio se producen un menor número de receptores de alta afinidad (Roy *et al.*, 1993), primando los de baja afinidad ya que el número de receptores se mantiene constante independientemente del selenio (Roy *et al.*, 1993; Sordillo *et al.*, 1993), por lo que se necesita un tiempo mayor para alcanzar la concentración umbral necesaria para comenzar la proliferación de los linfocitos T.

También se han utilizado mutágenos específicos de los linfocitos B como el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, con el que se ha podido observar una menor respuesta en animales deficientes en selenio-vitamina E (citado por Turner y Finch, 1991).

Sin embargo, parece que esta respuesta a mutágenos por parte de los linfocitos depende de la edad, ya que mientras que ovejas adultas mantenidas con una dieta deficiente en selenio y vitamina E presentan una buena respuesta a PHA, no ocurre de igual manera en corderos, en los que sí se produce un fallo en la respuesta de linfocitos T (citado por Turner y Finch, 1991). Estos mismos autores exponen una hipótesis a este respecto: en ovejas adultas los microorganismos existentes en el rumen poseen unas cantidades de selenio muy altas, que podrían ser puestas a disposición de las células inmunocompetentes cuando ésto fuese necesario.

Esta alteración en la proliferación de los linfocitos, puede ser detenida e incluso invertida mediante la inyección de selenito sódico al animal o la adición de éste al medio de cultivo de las células. Esto indicaría que el fallo radicaría en el ambiente celular más que en la célula en sí (citado por Turner y Finch, 1991). Pero otros autores han advertido de la posibilidad de que aparezcan aberraciones cromosómicas cuando se administra selenio en cantidades superiores a las necesarias; las cantidades necesarias para que los linfocitos presenten una mayor respuesta son de 1 ng/ml de medio de cultivo, con cantidades de 10 ng/ml se alcanza una meseta, y con 1 µg/ml se produce una espectacular caída (Citado por Turner y Finch, 1991). Incluso se señala que la adición de 6 ng Se/ml al medio de cultivo

provoca la aparición de un 13% de células aberrantes, porcentaje que llega al 40% si las cantidades añadidas son de 600 ng/ml.

1.X- SELENIO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Hemos visto como la deficiencia en selenio provoca la disminución de la respuesta inmune en cada uno de sus aspectos, pero veremos ahora lo que ocurre cuando todos estos mecanismos actúan conjuntamente.

La suplementación con selenio-vitamina E durante los periodos de gestación y lactación en cerdas podría disminuir las pérdidas por el síndrome mastitis-metritis-agalaxia porcino (Whitehair, citado por Miller, 1985). Erskine *et al.* (1987) describe que la leche de los animales suplementados con selenio y vitamina E presentaban recuentos celulares menores que los no suplementados, y que estos animales resistían mejor a las infecciones mamarias por *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. Además, las mamitis en estos animales tenían una menor duración, así como una menor gravedad de los signos clínicos. Estos autores afirman que este hecho se debe a que en los animales deficientes se produce una menor actividad GSHPx, y esto implicaría una menor eficacia bactericida, sobre todo si la bacteria ingerida presenta algún mecanismo para degradar los peróxidos formados durante la fagocitosis.

Lo expuesto anteriormente se vio confirmado con estudios sobre mamitis provocadas por *E. coli* (Erskine *et al.*, 1989). Estos autores comprobaron cómo, nuevamente, los animales suplementados con selenio y vitamina E presentaban menos problemas de mamitis por este agente patógeno que los no suplementados, siendo menor la frecuencia de aparición de la mamitis y también menor la duración de la misma. Atribuyen este hecho a una mejor movilización de los neutrófilos desde el torrente circulatorio, y a una mayor capacidad fagocítica de los neutrófilos observada *in vitro*. Los neutrófilos de vacas deficientes demostraron una menor capacidad bactericida tanto frente a *Candida albicans* como frente a *S. aureus*. Sin embargo, en estudios realizados por el mismo autor con posterioridad no llega a esta misma conclusión sobre el efecto del selenio en las mamitis por *S. aureus* (Erskine *et al.*, 1990), ya que en este estudio no vio diferencias entre el grupo deficiente y el suplementado, aunque justifica esto en que mientras que en las mamitis por *E. coli* son

bastante frecuentes las formas agudas de la enfermedad, en las producidas por *S. aureus* no lo son tanto, y además este último presenta una mejor adaptación a la mama.

Por otro lado, Braun *et al.* (1991) confirma la mayor gravedad de las mamitis en los animales selenio deficientes, ya que la suplementación con selenio produce un aumento del número de leucocitos que llegan a la glándula, y, por tanto, a un aumento de la fagocitosis que produce un descenso en el número de bacterias viables.

También en otras enfermedades transmisibles se aprecia una mejor respuesta, como ocurre en los pollos con la coccidiosis (Colnago *et al.*, 1984a). Estos autores describen cambios en el número de leucocitos circulantes en pollos inmunizados infectados con distintas especies de *Eimeria* cuando se les suplementa la dieta con selenio. Asimismo observan cómo una suplementación con selenio y vitamina E produce un aumento en la ganancia de peso de pollos no inmunizados frente a *E. tenella*, así como una disminución de la mortalidad (Colnago *et al.*, 1984b). Esta mejora de la respuesta inmune parece afectar a los mecanismos de defensa general frente a infestaciones primarias. Llegan incluso a exponer su sospecha de que estas mejorías son debidas a un aumento de la fagocitosis.

Sin embargo, la concentración de selenio no tiene incidencia sobre la infestación por *Haemonchus contortus* en oveja (Jelinek *et al.*, 1988), aunque el mismo autor lo atribuye a que las ovejas selenio-deficientes utilizadas en su experiencia presentaron amplias reservas de α -tocoferol, que podría haber compensado la deficiencia en selenio. Por otra parte, la utilización de dietas suplementadas con selenio sí parecen tener influencia sobre la infección por *Serpulina hyodysenteriae*, anteriormente incluida en el género *Treponema*, (Teige *et al.*, 1984), ya que la resistencia a este agente fue mayor en los grupos suplementados que en el no suplementado. Si bien hemos de señalar la aparición de un resultado cuando menos curioso muy similar al descrito por Blodgett *et al.* (1986) en producción de anticuerpos, ya que el grupo al que se administró la cantidad más alta de selenio no presentó diferencias significativas con el no suplementado, lo que nos confirma la sospecha de que el aporte de selenio por encima de determinadas cantidades (0,8-0,9 mg/Kg) no produce beneficio alguno.

Con lo expuesto hasta el momento parece claro que la deficiencia en selenio afecta a la función de los neutrófilos polimorfonucleares asociada a los cambios fisiológicos en los

niveles de GSHPx. Los neutrófilos de vacas mantenidas experimentalmente con dietas deficientes en selenio presentan un menor consumo de oxígeno, así como menores actividades de GSHPx que en el caso de neutrófilos de vacas con una dieta normal (Erskine *et al.*, 1987, 1989). Este mismo autor ha comprobado que la deficiencia en selenio provoca la disminución en la producción de leucotrieno B₄, un metabolito de la lipooxigenación del ácido araquidónico por los neutrófilos que además actúa como un potente quimiotáctico y estimulante quimiocinético para los neutrófilos, lo que provoca una disfunción de éstos (Erskine *et al.*, 1989).

Estos cambios pueden hacer que un animal deficiente sea más sensible a enfermedades infecciosas, aunque por el momento no parece existir prueba alguna acerca de una mayor incidencia o gravedad de enfermedades infecciosas entre animales naturalmente deficientes en selenio o vitamina E. Los neutrófilos de animales deficientes pierden parte de su capacidad para fagocitar algunos microorganismos, aunque no es conocida la relevancia que esto pueda tener en las infecciones naturales.

En resumen, podemos afirmar que una deficiencia en selenio se traduce en una menor capacidad del sistema inmune, y, por tanto, en una mayor susceptibilidad para padecer enfermedades.

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

Ya hemos apuntado anteriormente que la listeriosis precisa de una serie de factores predisponentes. Estos factores conducen a un estado de inmunodeficiencia más o menos acusado, bien por la existencia de un estado patológico subyacente, por actuación médica o de forma fisiológica. Sin embargo, estos factores conocidos no son capaces de explicar todos los casos que se producen, es decir, deben existir otros factores predisponentes desconocidos por el momento como tales. Entre estos últimos cabría incluir los estados de deficiencias nutricionales tanto las que cursan en forma manifiesta, que haría fácil establecer una correlación causa-efecto, como las microdeficiencias, es decir, todo aquél estado en el que existe una deficiencia de un determinado elemento que no es suficiente como para provocar alteraciones visibles.

A pesar de los puntos oscuros existentes todavía en la patogenia de la listeriosis, existe un convencimiento general de que la principal vía de transmisión es la oral, ya que en los últimos brotes ocurridos en el hombre y los animales la infección se ha producido a través de alimentos. Sin embargo, la mayoría de los autores prefiere utilizar la vía intragástrica como vía experimental de infección al requerir dosis algo inferiores que la vía oral. Consideramos como vía oral aquella en que el individuo ingiere las listerias con el agua o el alimento, permitiendo el contacto de las bacterias con todo el tracto digestivo.

Además, los datos epidemiológicos existentes muestran una mayor prevalencia del serovar 4b que del 1/2a en los brotes, aunque no existen datos que confirmen una mayor frecuencia de aislamientos de 4b que de 1/2a de muestras ambientales.

Por todo lo expuesto, decidimos investigar, utilizando el modelo experimental murino:

- 1- las repercusiones que una microdeficiencia en selenio y vitamina E podría tener en la susceptibilidad a la listeriosis, para lo que comparamos animales deficientes y no deficientes;
- 2- la dinámica de la infección y la mortalidad por vía oral, en comparación con la vía endovenosa como referencia y con la vía intragástrica;

- 3- la repercusión en la infección que podría tener la inoculación oral con una única dosis o con dosis repetidas durante un cierto período de tiempo;
- 4- la existencia de diferencias en la infección por vía oral con los dos serotipos más frecuentes en los brotes de listeriosis (4b y 1/2a).

3. MATERIAL Y METODOS

3.I- MATERIAL

Para la realización del presente trabajo utilizamos el material general propio de un laboratorio de microbiología, es decir, placas de petri, tubos de ensayo de distintos tamaños, tubos estériles de polipropileno, matraces, mecheros, asas de platino, gradillas, pipetas ordinarias de distintas medidas, pipetas Pasteur, pipetas automáticas dosificadoras de volumen variable (de 0 a 1 ml, y de 0 a 200 µl) con sus puntas desechables respectivas, frascos de vidrio, probetas, filtros estériles de 22 µm de un solo uso, etc. Asimismo, hemos utilizado jeringas estériles de 1 cc (insulina) con sus agujas para las inoculaciones endovenosas.

En cuanto a los aparatos empleados, también han sido los de uso rutinario en un laboratorio de microbiología, como autoclaves, estufas de incubación, cámara de refrigeración, arcones congeladores de -20 y -80°C, centrífugas, baños-maría, balanzas, microscopio óptico, agitadores-calentadores magnéticos, etc. Entre todos ellos, debemos resaltar el uso de una lupa estereoscópica Wild 376788, básica a la hora de reconocer las presumibles colonias de listerias, así como el de un homogeneizador Stomacher IUL Tipo 0480 que nos facilitó la labor de homogeneización de las muestras.

3.II- MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo para la obtención del inóculo

Brain Heart Infusion (BHI) (Difco).....37 g

Agua destilada.....1000 ml

Una vez disuelto el medio se separan unos 100 ml a otro matraz, y se esterilizan a 121°C 15 minutos ambos matraces.

- BHI Agar (medio de recuento)

BHI (Difco).....37 g

Agar.....15 g

Agua destilada.....1000 ml

Se disuelven perfectamente tanto el BHI como el agar en el agua y se esterilizan a 121°C 15 minutos. Tras la esterilización se deja enfriar el medio hasta unos 45-50°C y se distribuye en placas de petri.

- Listeria Selective Agar Medium modified (LSAMm)

| | |
|------------------------------|---------|
| BHI (Difco)..... | 37 g |
| Cloruro de litio..... | 15 g |
| Esculina..... | 0,75 g |
| Citrato amónico-férrico..... | 0,5 g |
| Acriflavina..... | 5 mg |
| Polimixina..... | 10 mg |
| Ceftazidima..... | 20 mg |
| Telurito potásico..... | 40 mg |
| Agar..... | 15 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

En 900 ml de agua se disuelven las cantidades indicadas de BHI, cloruro de litio, esculina, acriflavina y agar; mientras que en los 100 ml restantes se disuelve el citrato amónico-férrico en otro matraz. Estos matraces se esterilizan a 121°C durante 15 minutos, tras lo cual se dejan enfriar hasta unos 50°C, se mezclan y se añaden los restantes componentes. A continuación se procede a su distribución en placas de petri.

3.III- SOLUCIONES

- Solución salina

| | |
|---------------------|---------|
| Cloruro sódico..... | 9 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

- Solución de polimixina

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Sulfato de Polimixina B (Sigma)..... | 1 g |
|--------------------------------------|-----|

Agua destilada.....100 ml

De esta solución se añaden 1 ml/L de LSAMm.

- Solución de ceftazidima

Ceftazidima sódica pentahidratada (Glaxo).....2 g

Agua destilada.....100 ml

Para preparar 1 L de LSAMm se le añaden 1 ml de esta preparación.

- Solución de telurito potásico

Telurito potásico.....4 g

Agua destilada.....100 ml

Se utilizaba 1 ml para preparar 1 L de LSAMm.

- Solución tamponada de formalina

Formol 37-40% (Panreac).....100 ml

Fosfato sódico dibásico anhidro (Merck).....0,8 g

Fosfato disódico anhidro (Fluka).....1,3 g

Agua destilada.....900 ml

- Solución de gelatina-alumbre

Solución A: Gelatina (Panreac).....2,25 g

Agua destilada.....500 ml

Solución B: Timol (Merck).....un cristal

Detergente (Mistol).....dos gotas

Alumbre crómico $[\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$

(Merck).....0,733 g
 Agua destilada.....19,3 ml

Se prepara la solución A a 55-60°C y, una vez disuelta la gelatina, se añade la solución B.

- Solución de Hematoxilina de Mayer

Hematoxilina (Merck).....1 g
 Agua destilada.....1000 ml
 Yodato sódico (Merck).....0,2 g
 Alumbre potásico [(SO₄)₂KAl.12H₂O] (Merck).....50 g
 Acido cítrico (C. Erba).....1 g
 Hidrato de cloral (C. Erba).....50 g

Disolver el alumbre en el agua, añadir y disolver la hematoxilina. A continuación añadir el yodato sódico, el ácido cítrico y el hidrato de cloral y agitar hasta su total disolución. La solución resultante presenta una coloración rojo-violeta, y se mantiene estable durante varios mese. Es importante seguir el orden dado en su elaboración.

- Solución de eosina al 1%

Eosina amarillenta.....1 g
 Agua destilada.....100 ml
 Acido acético.....2-3 gotas

3.IV- CEPAS

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado, básicamente, una cepa de *L. monocytogenes* de origen clínico denominada P-14B, perteneciente al serovar 4b. Esta cepa fue aislada a partir de un enfermo de listeriosis durante un pequeño brote humano ocurrido en Valencia en 1989 (Vázquez-Boland *et al.*, 1991).

Para los estudios de patogenicidad comparada se utilizó, además, la cepa tipo de *L. monocytogenes* 1/2a NCTC 7973.

3.V- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Los animales utilizados para la presente experiencia fueron ratones de tipo Swiss de la estirpe CD-1, criados en nuestro laboratorio. Las edades de estos animales oscilaron entre las 10 y las 12 semanas al inicio de cada experimento, lo que significa un peso aproximado entre 20 y 25 gramos/ratón.

3.VI- ALIMENTO Y AGUA DE BEBIDA

3.VI.a- RATONES NORMALES

El pienso empleado para la alimentación de los animales normales fue un pienso comercial elaborado por la casa Interfauna Ibérica S.A., cuya composición, facilitada por el fabricante es:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Cenizas..... | 58 g/Kg |
| Grasa bruta..... | 21 » |
| Proteína bruta..... | 145 » |
| Fibra bruta..... | 50 » |
| Carbohidratos..... | 59 » |
| Energía digestible en MJ/Kg..... | 123 |

En cuanto a las cantidades de selenio y vitamina E, éstas fueron de 0,09 mg/g y de 90 UI/Kg respectivamente.

El agua empleada para estos ratones fue agua corriente.

3.VI.b- RATONES DEFICIENTES EN SELENIO Y VITAMINA E

El pienso utilizado para obtener ratones deficientes en selenio y vitamina E fue un

pienso especial suministrado por Panlab S.L., con menos de 0,03 mg/Kg de selenio y no más de 8 mg/Kg de vitamina E.

El agua empleada para estos animales fue agua ultrapura (MilliQ) suplementada con cloruro sódico (2,8 g/l) y glucosa (5 g/l).

Para saber el tiempo necesario para obtener animales deficientes se realizaron análisis de selenio en hígado durante varias semanas. De esta manera, observamos que tras seis semanas con esta dieta las concentraciones de selenio en este órgano eran muy inferiores a la de los animales control, sin que se observaran síntomas alguno de la deficiencia, ni se pudiera observar alteración histológica alguna. También se realizaron controles consistentes en comparar el tiempo necesario para que se produjera hemólisis evidente en una muestra de sangre. Este tiempo fue siempre de 48-72 horas menos en los deficientes que en los controles utilizados.

3.VII- OBTENCION DEL INOCULO

La cepa utilizada era sembrada en BHI Agar y se incubaba a 37°C durante 18-24 horas, tras esta incubación se comprobaba la pureza del crecimiento mediante observación macroscópica y tinción de Gram. A continuación, se inoculaba un matraz con 100 ml de BHI que se incubaba en agitación orbital otras 18-24 horas a 37°C.

Este matraz era utilizado para inocular otro con 900 ml de BHI, después de comprobar mediante una tinción de Gram su pureza. También este matraz se incubaba a 37°C en agitación orbital durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaba a 10000 g. De esta manera pretendíamos obtener las bacterias, por lo que despreciábamos el sobrenadante. El sedimento era resuspendido en solución salina estéril y nuevamente centrifugado a 10000g para eliminar todo el medio.

Nuevamente despreciábamos el sobrenadante conservando el sedimento, que era resuspendido en 80 ml de solución salina estéril. Una vez resuspendido el sedimento era alicuotado en tubos estériles de polipropileno (2 ml/tubo) y almacenado en congelación a -80°C hasta el momento de ser utilizado.

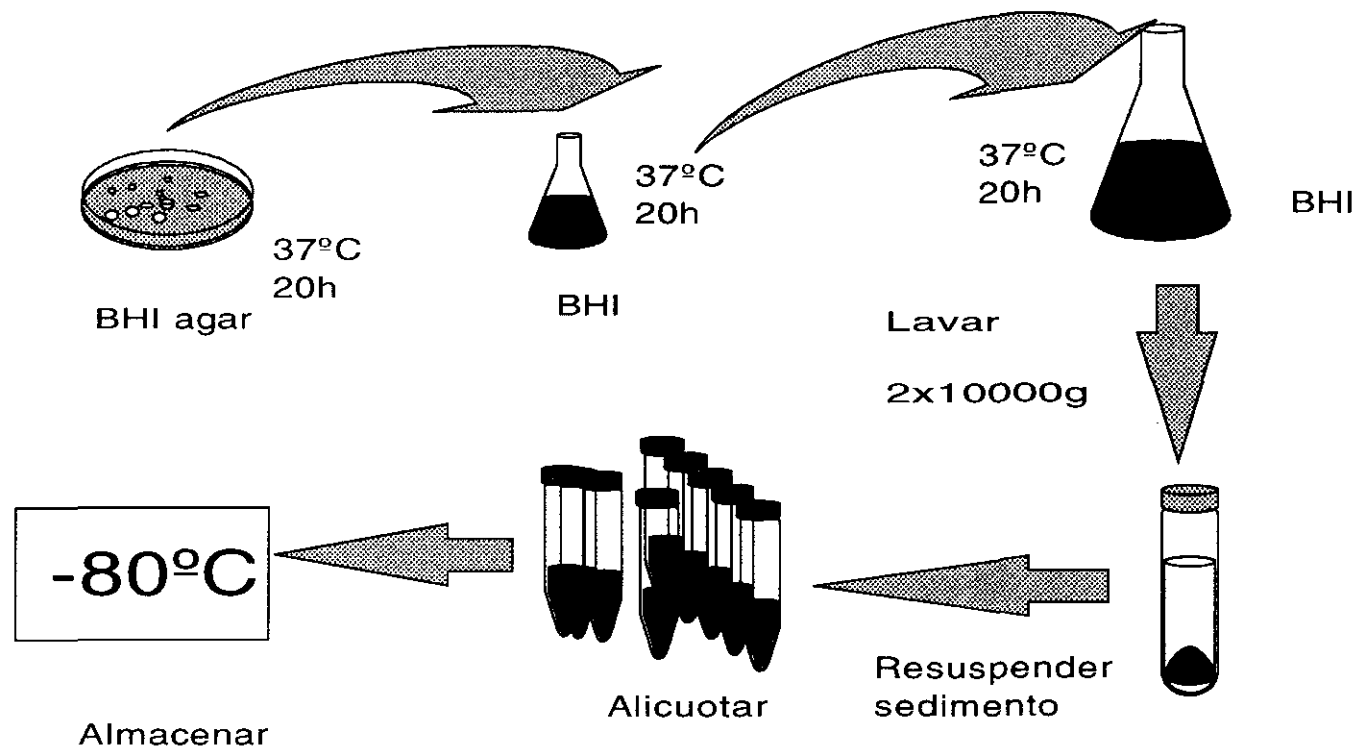


Figura 6- Obtención del inóculo.

Antes de su congelación se realizó un recuento de las bacterias así obtenidas, para lo cual se realizaban diluciones decimales de la suspensión de bacterias, sembrándose 100 μ L de las que se estimaban adecuadas en BHI Agar. Estos recuentos dieron siempre un resultado muy similar, que osciló entre 1×10^{10} y 3×10^{10} UFC/ml. Para asegurarnos que la congelación a -80°C no afectaba de forma importante a nuestras bacterias, realizamos los recuentos después de la congelación siguiendo la misma metodología ya reseñada. Los resultados obtenidos no variaron sustancialmente de los obtenidos antes de la congelación.

De forma esquemática puede verse el proceso en la figura 6.

3.VIII- INOCULACIONES

3.VIII.a- INOCULACIONES ENDOVENOSAS

Dos días antes de la inoculación se descongelaba un tubo de inóculo y se realizaba un recuento del número de bacterias/ml, mediante diluciones decimales y siembra de 100 μ l en BHI Agar. De esta forma podíamos saber el número de bacterias que había en los tubos congelados, y preparar el inóculo cada vez con la dosis lo más exacta posible.

El día de la inoculación se descongelaba el número de tubos necesarios según el recuento realizado con anterioridad, y se hacían las diluciones necesarias para obtener las dosis requeridas con gran exactitud.

Para poder inocular las concentraciones requeridas se inocularon 100 μ L de una suspensión con una concentración de bacterias 10 veces mayor a la requerida en la vena dorsal del apéndice caudal de los ratones (figura 7).

Por otra, parte, los ratones cuya inoculación no fue perfecta fueron desechados, lo que aumenta la fiabilidad del experimento.

3.VIII.b- INOCULACIONES ORALES

También en este caso se descongelaba un tubo de inóculo varios días antes de la

inoculación, para poder hacer un recuento del número de bacterias por ml existentes en el inóculo. La metodología empleada fue la misma que la expuesta en el apartado anterior de inoculaciones endovenosas, es decir, mediante diluciones decimales y siembra de 100 µl en BHI Agar.

El día de la inoculación se descongelaba el número de tubos necesarios y se preparaba la cantidad necesaria de inóculo, administrándose como agua de bebida. El inóculo se mantuvo durante una noche, tiempo tras el cual se cambiaban los biberones, siempre vacíos, por los de agua normal. En los casos de inoculaciones repetidas durante varios días, el inóculo era renovado diariamente (figura 8).

Para calcular la cantidad de inóculo por ratón y día medimos la cantidad de agua bebida por un ratón durante varios días en distintas épocas del año, según nuestras estimaciones esa cantidad fue de unos 5 ml/ratón y día.

3.IX- SACRIFICIOS Y OBTENCION DE LOS ORGANOS

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de eter etílico, procediéndose inmediatamente a la recogida de los órganos a estudiar. Para ello en primer lugar se abría la piel de la zona ventral desde la unión de las ramas de la mandíbula hasta la región inguinal, a continuación se abría la musculatura abdominal por la línea blanca hasta la última costilla. Una vez abierta la cavidad abdominal se retiraba el paquete intestinal hacia un lado, y, con ayuda de una jeringa de insulina en ocasiones heparinizada, se recogía hasta 1 ml de sangre de la vena cava inferior (imagen 1). Esta sangre nos servía para comprobar si los animales deficientes lo eran realmente al comparar el tiempo de hemólisis de éstos y los controles.

Con la sangre ya recogida, procedíamos a la obtención del resto de muestras en el siguiente orden.

- Bazo;
- Hígado;

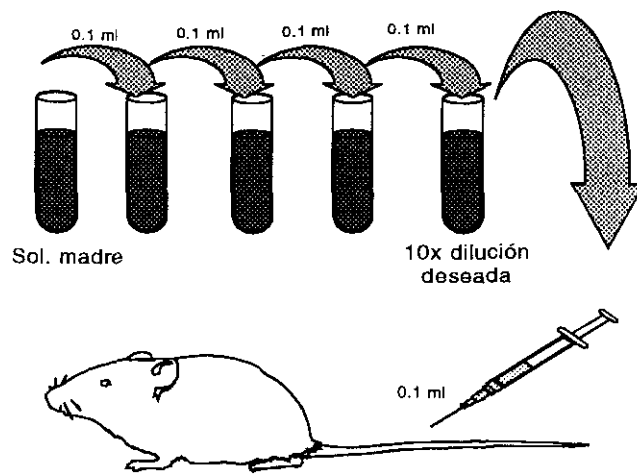


Figura 7-
Inoculación
intravenosa
(4b).

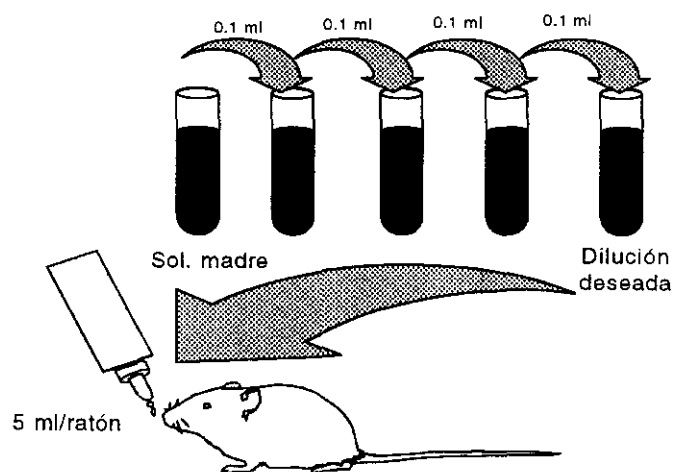


Figura 8-
Inoculación
por vía oral.

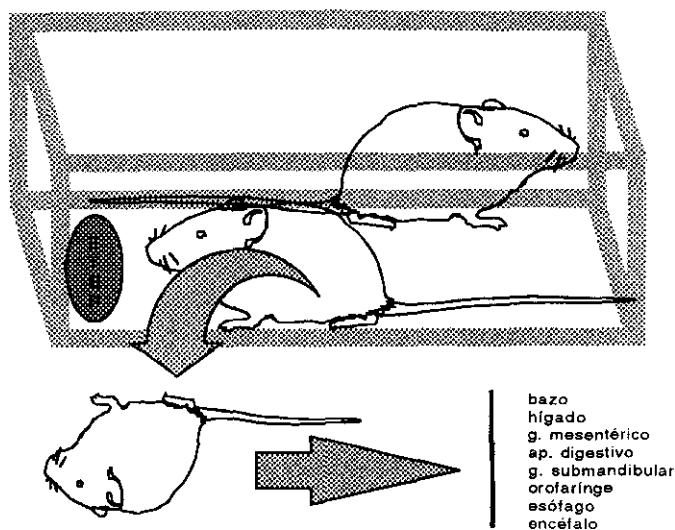


Figura 9- Sacrificio y toma de muestras.

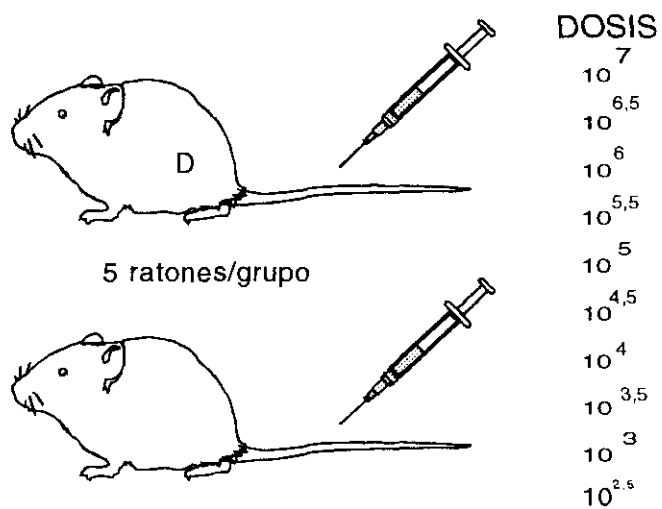


Figura 10- Cálculo de la DL50 por vía intravenosa (4b).

D= deficientes

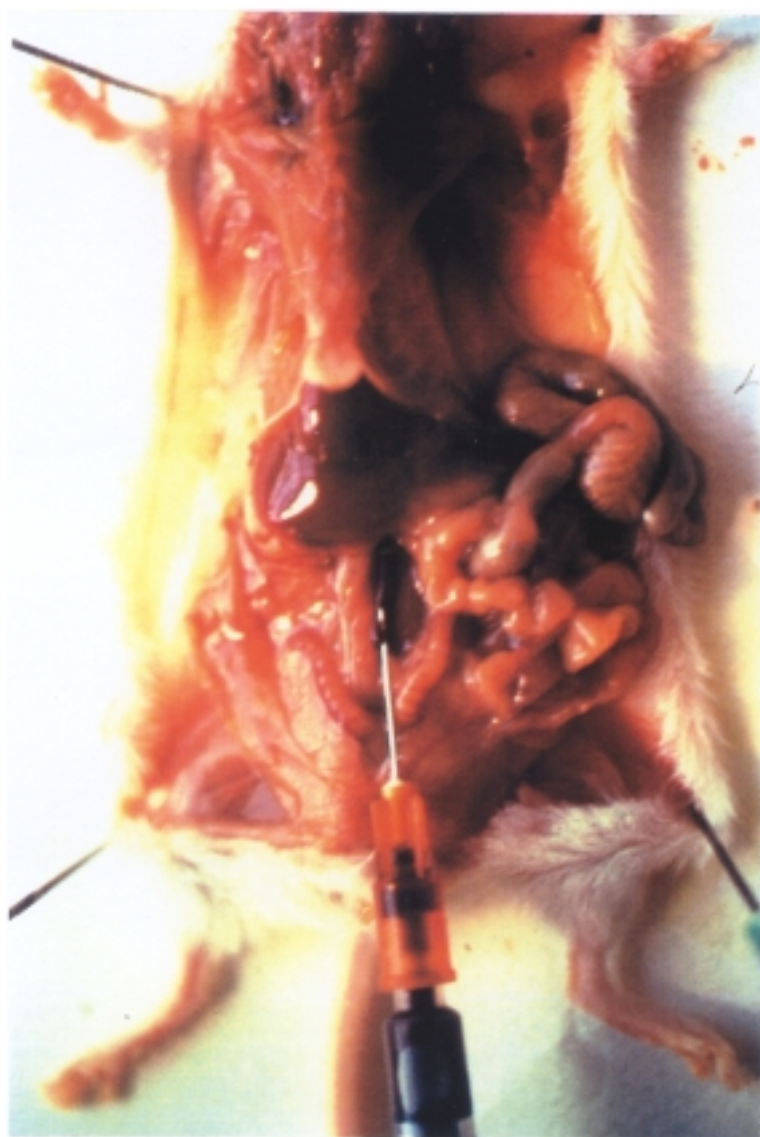


Imagen 1- Extracción de sangre de la vena cava inferior de un ratón.

- Ganglio mesentérico;

- Aparato digestivo: en primer lugar se cortaba a la altura de la ampolla rectal y del cardias, extrayendo todo el estómago e intestino conjuntamente a una placa de petri estéril, y, a continuación, se recogía cada muestra de forma independiente.

1- estómago;

2- intestino delgado, que era cortado en trozos más pequeños para facilitar su homogeneización;

3-intestino grueso, al igual que el delgado, también se cortó en trozos más pequeños.

- Ganglio submandibular, conjuntamente con las glándulas salivares situadas en esa región.

- Región orofaríngea: para recoger esta zona cortábamos los músculos de la zona inferior del cuello a la altura de sus inserciones en las ramas mandibulares, extrayendo la lengua hasta llegar a la faringe. De esta forma se pretendía tomar una porción de las formaciones linfoides del anillo orofaríngeo.

- Esófago.

3.X- CALCULO DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) POR VIA ENDOVENOSA

Para este cálculo se inocularon, por vía endovenosa, diez lotes de 5 ratones deficientes y 5 no deficientes cada uno, con distintas dosis. Las dosis empleadas fueron: 10^7 , $10^{6.5}$, 10^6 , $10^{5.5}$, 10^5 , $10^{4.5}$, 10^4 , $10^{3.5}$, 10^3 y $10^{2.5}$ UFC/ml (figura 10).

Estos lotes fueron observados durante 10 días, anotándose en cada momento el número de muertos por dosis. En los animales muertos se procedió a realizar aislamiento de listerias a partir del hígado, bazo y encéfalo, ya que sólo considerábamos como muertos por listeriosis

aquellos en los que se consiguió aislamiento de alguno de éstos órganos.

La extracción de los órganos se realizó tal como se explica en el apartado correspondiente.

Los órganos una vez extraídos eran introducidos en bolsas de homogeneización estériles. Estas bolsas habían sido pesadas previamente, con lo que con una nueva pesada y mediante una sencilla operación aritmética podíamos conocer el peso del órgano. Una vez pesado se homogeneizaba en un Homogeneizador tipo Stomacher, y se diluían los órganos al 1:10 (p:v) en solución salina estéril. A partir de esta primera dilución se realizaban nuevas diluciones decimales y se sembraban 100 microlitros en placas de LSAMm que eran incubadas a 37°C durante 48 horas antes de proceder al recuento de las colonias. De esta sencilla manera podíamos conocer la cantidad de listerias existentes en un gramo del órgano en cuestión.

Utilizamos como medio de aislamiento LSAMm, ya que al existir la posibilidad de tener que realizar aislamientos a partir de animales muertos la probabilidad de que crecieran bacterias contaminantes era bastante alta si utilizábamos medios generales. Por otra parte, esto también evitó el crecimiento de bacterias contaminantes en los cultivos a partir de intestino.

Una vez conocido el número de animales muertos por dosis se procedió al cálculo de la DL50, es decir, aquella dosis en la que morirían el 50% de los animales inoculados. Para este cálculo utilizamos el método de Kärber (Schmidt y Emmons, 1989). Este método utiliza la siguiente fórmula:

(Log de la dilución más alta utilizada)-

$$-\left[\frac{\text{suma del \% de mortalidad en cada dilución}}{100} - 0.5 \right] \times (\text{log del factor de dilución})$$

3.XI- ESTUDIOS DE MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA

Para estos estudios se inoculaban cuatro grupos de 48 ratones con las dosis a estudiar,

10^{10} y 10^9 UFC/ml, incluyendo dos grupo/dosis, uno de deficientes y otro no deficiente. Una vez inoculados se les daba su pienso y agua correspondiente, y se les observaba durante 10 días. Con los muertos se procedió tal y como se refleja en el apartado anterior (figura 11).

3.XII- ESTUDIO DE MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS

En este caso se utilizaron seis grupos de 48 ratones cada uno, de los cuales tres eran de deficientes y los otros tres de no deficientes, que fueron inoculados de la siguiente manera (figura 12):

- lote 1- 10^9 UFC/ml 4 días;
- lote 2- 10^9 UFC/ml 7 días; y,
- lote 3- 10^8 UFC/ml 10 días.

En todos los casos el inóculo era preparado diariamente, de tal manera que en los bebederos sólo se ponía la cantidad necesaria para un día.

El estudio se prolongó durante diez días desde la última toma del inóculo. Sólo se tomaron en consideración aquellos ratones muertos que dieron un cultivo positivo a partir de hígado.

3.XIII- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ENDOVENOSA

Con estos experimentos se pretendía conocer la dinámica de la infección en los dos tipos de ratones (deficientes en selenio y vitamina E y no deficientes) ante una infección experimental. Para ello se inocularon lotes de 24 ratones de cada tipo con las DL_{50} de cada tipo ($10^{4.5}$ y $10^{5.5}$ UFC/ml respectivamente). Tras la inoculación se sacrificaron los ratones a los siguientes tiempos post-inoculación: 30 minutos, 12 y 24 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días (figura 13). El número de ratones sacrificado en cada tanda fue de dos, de los cuales se realizaron cultivos a partir de hígado y bazo.

Los órganos eran extraídos de forma aséptica, e introducidos en bolsas de plástico estériles que habían sido pesadas previamente. De nuevo se pesaban las bolsas, ahora con el

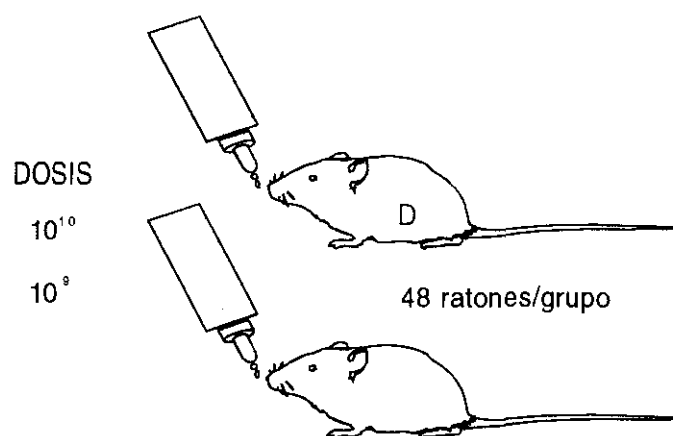


Figura 11-
Mortalidad por vía
oral con dosis única
(4b).

D= deficientes

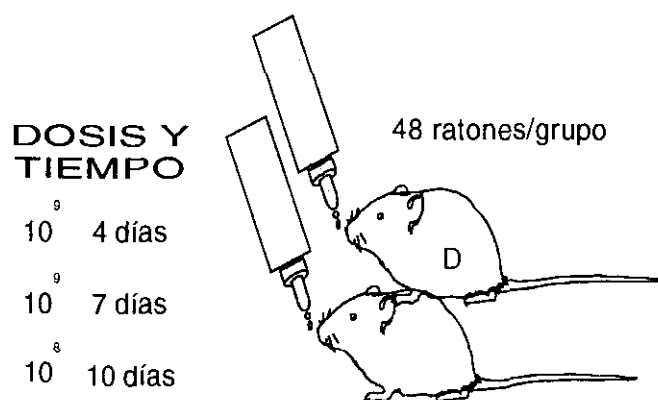


Figura 12- Mortalidad
por vía oral con dosis
repetidas (4b).

D= deficientes

$10^{4,5}$ $10^{5,5}$

30 min.

12 h

24 h

2 d

3 d

4 d

5 d

6 d

7 d

8 d

9 d

10 d

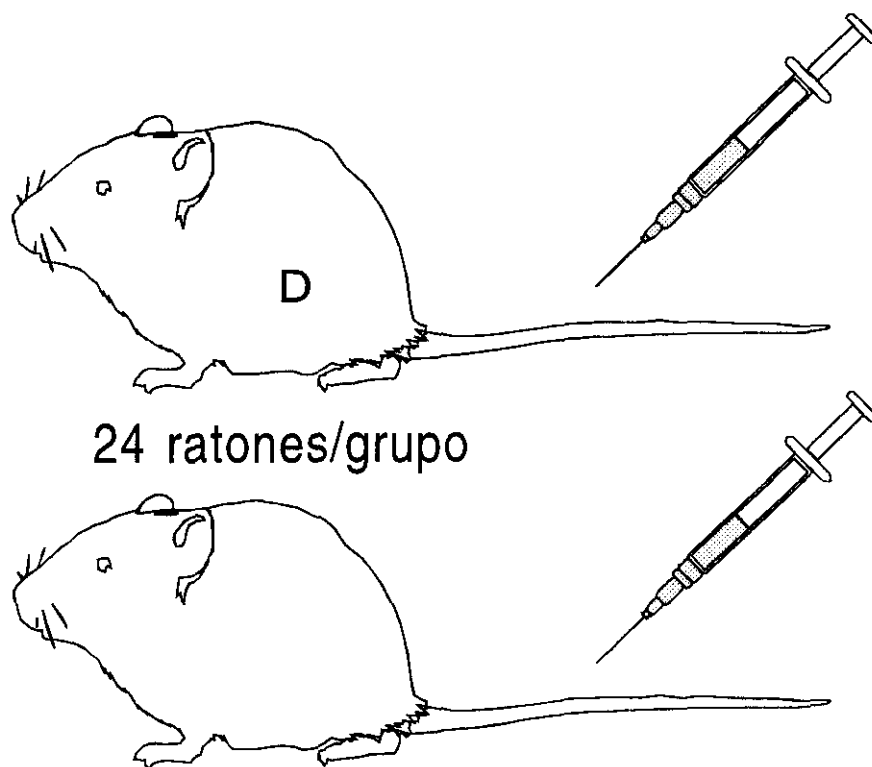


Figura 13- Seguimiento de la infección
por vía endovenosa. D= deficientes.

órgano en cuestión en su interior, y mediante una simple operación aritmética calculábamos el peso del órgano extraído. Una vez conocido este dato se homogeneizaba con ayuda del Stomacher y se diluía al 1:10 (p:v), realizándose siembras a partir de diluciones decimales del homogeneizado, para ver, no sólo la presencia o no de listerias, sino poder cuantificar ésta presencia.

3.XIV- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL

3.XIV.a- SEGUN LA VIA DE INOCULACION EMPLEADA

Para este estudio se utilizaron las vías oral e intragástrica. Para la primera se procedió exactamente igual a como se ha descrito en la experiencia del seguimiento de la infección por vía oral, esto es, se administró el inóculo con el agua de bebida. En el caso de la vía intragástrica se utilizó una sonda de extremo romo para depositar el inóculo en el estómago. Como control de la correcta inoculación se realizaron cultivos de pulmón de los animales sondados.

El inóculo empleado fue de 10^9 UFC Lm/ml, en ambos casos, y las muestras fueron recogidas a las 6, 12, 24 h, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días post-inoculación. Estas muestras fueron hígado, bazo, ganglios mandibular y mesentérico, región orofaríngea, esófago, estómago, intestino delgado y grueso.

El número de ratones fue de 44 animales por grupo, no se emplearon animales deficientes (figura 14). En cada momento se sacrificaron 4 animales/grupo mediante inhalación de eter etílico, de los cuales 2 se destinaron al estudio microbiológico y 2 al estudio histopatológico.

3.XIV.b- SEGUN LA CEPA EMPLEADA

En este caso se inocularon dos cepas de *L. monocytogenes* (P-14B y 1/2a) por vía oral únicamente. Como en los casos anteriores la inoculación se realizó mediante el agua de bebida, y la dosis inoculada fue de 10^9 UFC/ml (figura 15).

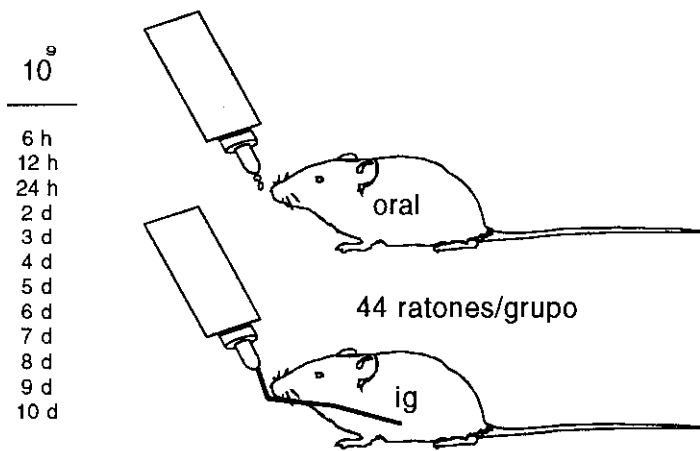


Figura 14-
Comparación de la
infección por las
vías oral e
intragástrica (1/2a).

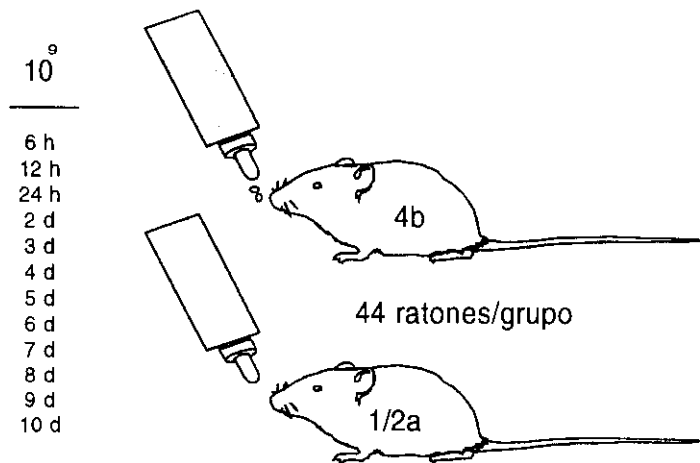


Figura 15-
Comparación de la
infección con los
servares 1/2a y 4b.

Se utilizaron 44 ratones/cepa, tampoco en este caso se emplearon animales deficientes. Tanto los tiempos post-inoculación a los que se sacrificaron, como el método de sacrificio, como las muestras recogidas fueron los mismos que en el caso anterior.

3.XIV.c- SEGUN DOSIFICACION: UNICA O REPETIDA

Para esta experiencia se emplearon dos lotes de 48 animales divididos en cuatro grupos de 24 ratones, dos de deficientes y dos de controles. Los cuatro grupos bebieron un inóculo de 10^9 UFC/ml, pero mientras que el lote 1 lo hizo únicamente durante un día, el lote 2 lo hizo durante 7 días. Los tiempos a los que se procedió al sacrificio de animales fueron 1, 3, 6, 11 y 16 días desde la última inoculación (figura 16).

Se sacrificaron 5 animales cada vez, a excepción de la última en que se sacrificaron 4. De los 5 animales 3 fueron muestreados para microbiología y 2 para histología, mientras que en el último sacrificio sólo se muestrearon 2 para microbiología manteniéndose los otros 2 para histología. Las muestras tomadas y su procesamiento fue el mismo que en los casos anteriores.

3.XV- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL EN RATONES DEFICIENTES/NO DEFICIENTES

3.XV.a- ESTUDIO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA

En este caso empleamos dos grupos de 54 ratones, uno de deficientes y otro de control, que bebieron un inóculo de 10^9 UFC/ml durante un día. Los sacrificios se realizaron a los siguientes tiempos post-inoculación: 30 min, 6, 12 y 24 h, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 16 días (figura 17).

Se sacrificaron cuatro animales por grupo cada vez, de éstos dos fueron utilizados para microbiología y los dos restantes para histopatología e inmunohistoquímica. El muestreo realizado fue más amplio que en el caso anterior, tomándose muestras de bazo, hígado, ganglio mesentérico, ganglios mandibulares, región orofaríngea, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso.

10^9 1 día

10^9 7 días

1
3
6
11
16

Días desde
la última toma

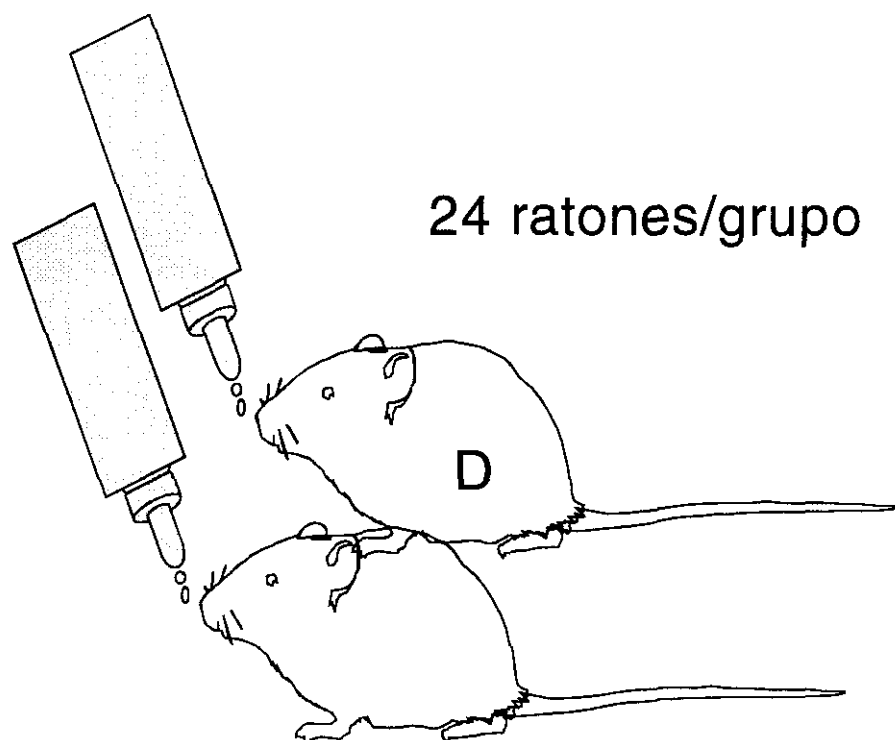


Figura 16-
Comparación de
la infección
según el tiempo
de bebida del
inóculo.

D= deficientes

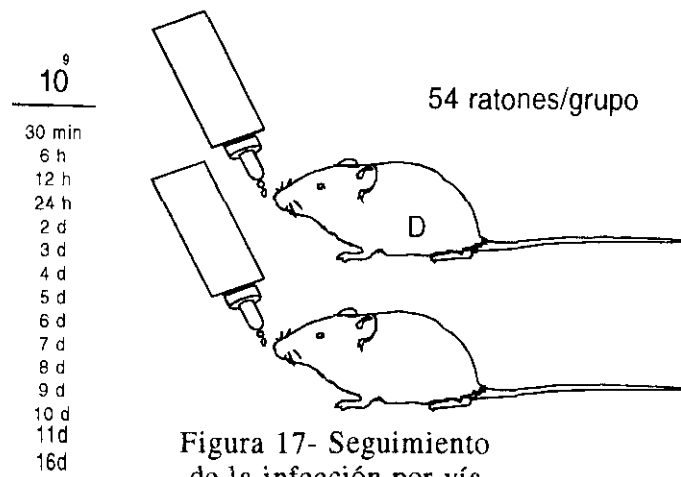


Figura 17- Seguimiento de la infección por vía oral con dosis única (4b).

D= deficientes

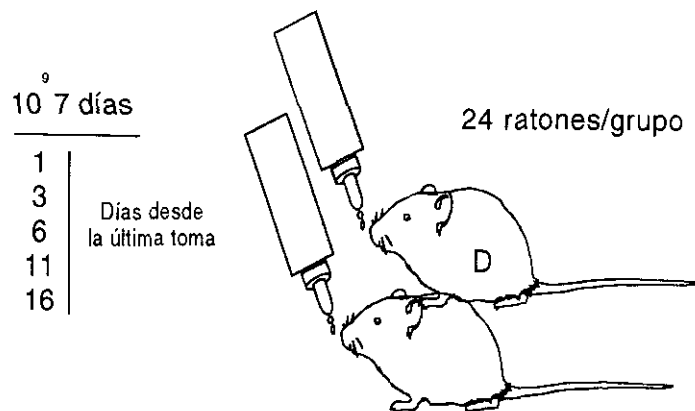


Figura 18- Seguimiento de la infección por vía oral con dosis repetidas (4b).

D= deficientes

Una vez recogidas las muestras fueron procesadas de la misma manera que en el caso anterior.

3.XV.b- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS

La mecánica seguida para esta experiencia fue similar a la empleada para el seguimiento con dosis única. Se utilizaron dos grupos de ratones, uno de ratones deficientes y otro de no deficientes, de 24 animales cada uno. Cada grupo recibió un inóculo de 10^9 UFC/ml durante 7 días.

Los tiempos de sacrificios fueron 1, 3, 6, 11, 16 días contados desde la última toma de inóculo (figura 18). Se sacrificaron 5 animales de cada grupo cada vez, tres de los cuales se muestrearon para microbiología y los dos restantes para histopatología.

Las muestras recogidas y su procesamiento fue idéntico al realizado con dosis única.

3.XVI- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

3.XVI.a- PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Paralelamente al estudio microbiológico se realizó un estudio histopatológico de las muestras. Para lo cual los órganos destinados a este efecto eran fijados en formalina tamponada.

A continuación, los órganos fueron tallados para orientar definitivamente su superficie de corte. Para lo cual, se obtuvieron bloques de tejidos de 0,5 cm de espesor mediante hojas de bisturí. Tras el tallado de las muestras se colocaron en cassettes especiales en las que pasaron el proceso de inclusión.

Las cassettes conteniendo las muestras se introdujeron en un procesador de tejidos para su inclusión en parafina. La pauta seguida fue:

| | |
|------------------------------|--------|
| Alcohol etílico 50%..... | 3 h |
| Alcohol etílico 70%..... | 2 h |
| Alcohol etílico 80%..... | 1 h |
| Alcohol etílico 96%..... | 2 h |
| Alcohol etílico 100% I..... | 1 h |
| Alcohol etílico 100% II..... | 1 h |
| Metil benzoato..... | 30 min |
| Benceno I..... | 45 min |
| Benceno II..... | 30 min |
| Parafina I..... | 2 h |
| Parafina II..... | 4 h |
| Parafina III..... | 1 h |

El paso final de la inclusión consistió en la formación de bloques agrupando las muestras y orientándolas para obtener los mejores cortes. Este proceso se realizó en una unidad formadora de bloques mediante el empleo de moldes metálicos conteniendo las muestras ya orientadas en parafina líquida a 60°C (parafina III) y que se depositaron sobre una placa fría sobre la que la parafina solidifica rápidamente. El molde se separó y los bloques de tejidos pasaron a ser procesados en el microtomo.

Antes de efectuar los cortes histológicos los portas fueron tratados con una solución de gelatina-alumbre para evitar el desprendimiento de la muestra durante la realización de las técnicas inmunohistológicas. Para ello:

- 1- se sumergieron los portaobjetos en NaOH 1N (solución acuosa al 4%) durante una noche a 60°C;
- 2- a continuación se lavaron en agua corriente 15 minutos;
- 3- se sumergieron en ClH 1N 5 minutos;
- 4- volvieron a ser lavados en agua corriente 15 minutos;
- 5- se introdujeron en la solución de gelatina-alumbre a 60°C durante 15 minutos; y,
- 6- se secaron y dejaron a cubierto.

Los bloques fueron cortados en un microtomo de rotación y cuchillas de acero desechables (Biocut 3100). Se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor que fueron depositados en un baño de agua caliente (37°C) que permitiera la dilatación de la parafina hasta alcanzar la superficie que tenía en el bloque. Estos cortes se recogieron en portas tratados con gelatina-alumbre, y se dejaron secar una noche a 37°C.

3.XVI.b- ESTUDIO HISTOLOGICO

La valoración de las lesiones en las muestras se realizó con el método de la hematoxilina-eosina según el siguiente protocolo:

- 1- desparafinar e hidratar;
- 2- tinción con la solución de hematoxilina 2-10 minutos;
- 3- lavado en agua corriente 20 minutos;
- 4- tinción con la solución de eosina 1 minuto;
- 5- alcohol de 96° 1 minuto;
- 6- deshidratar con un cambio rápido en alcohol de 96°, y dos de 5 minutos en alcohol absoluto;
- 7- aclarar en xileno, dos cambios de 5 minutos; y,
- 8- montar en Eukitt.

Con esta técnica se consiguen observar las membranas con un color azul, y los citoplasmas en tonos de rosa.

3.XVII- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE SELENIO

Las determinaciones de las concentraciones de selenio, tanto en los ratones deficientes como en los controles, se realizaron en muestras de hígado tomadas al azar a distintos tiempos de sacrificios. La concentración de selenio fue cuantificada por espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros, tras una digestión completa de las muestras en reactor a presión en horno microondas. Estos análisis fueron realizados por ITSEMAP SEGURIDAD AMBIENTAL S.A. en sus laboratorios.

3.XVIII- VALORACION DE LA DEFICIENCIA EN SELENIO EN FUNCION DEL GRADO DE HEMOLISIS

La deficiencia en selenio provoca una mayor fragilidad en las membranas de los eritrocitos, lo que se traduce en una mayor facilidad para su ruptura (Koller y Exon, 1986; Boyne y Arthur, 1990; Bedwal *et al.* 1993). Según esto, la sangre de animales deficientes se hemolizará antes que la de animales no deficientes. Con esto ideamos un sistema para valorar la existencia de deficiencia según el grado de hemólisis obtenido durante los 4 primeros días desde su obtención, tal y como puede apreciarse en la tabla 6. Para lo cual se extrajo sangre de la vena cava inferior de los ratones, con ayuda de una jeringa de insulina heparinizada, y se introdujo en tubos que se mantuvieron a 4°C durante 4 días, observándolos cada día.

3.XIX- ESTUDIO ESTADISTICO

Se realizó un estudio de significación estadística de los resultados obtenidos con animales deficientes y no deficientes, para lo cuál se realizó un análisis multivariante de medidas repetidas con el programa estadístico SAS.

| Días | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------|---|--------|------------|-------|
| Deficientes | + | ++/+++ | ++++/+++++ | +++++ |
| No deficientes | - | - | + | ++ |

- ausencia total de hemólisis

+ hemólisis débil

+++ hemólisis evidente

++ ligera hemólisis

++++ hemólisis total

Tabla 6- Valoración de la deficiencia en selenio en función del grado de hemólisis,

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1- VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO EN HIGADO

Para valorar la posible deficiencia en selenio se realizó la determinación de su concentración en el hígado de los ratones muestreados mediante espectrofotometría de absorción atómica. Se utilizó la determinación en hígado porque consideramos que los valores hepáticos de selenio son más estables que los séricos, no estando sometidos a fluctuaciones dependientes del estado de hidratación o ingesta. Los resultados de estas determinaciones pueden verse en la tabla 7. En ella se puede apreciar cómo estos valores tuvieron un máximo de 3,93 mg/Kg, un mínimo de 0,94 mg/Kg con una media de 2,151 mg/Kg para los grupos control; y 0,606, menos de 0,015 y 0,192 mg/Kg respectivamente para los alimentados con la dieta deficiente.

La mayoría de los autores consultados utilizan como valor de referencia de selenio su concentración en suero, lo que permite la repetición del muestreo. Sin embargo, Blood *et al.* (1986) señala unos valores de selenio en hígado para el ganado vacuno de 0,9 a 1,75 mg/Kg en el caso de animales normales (animales con cantidades fisiológicas de selenio), y de 0,07 a 0,6 mg/Kg en el caso de animales deficientes. Estos intervalos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (Jelinek *et al.*, 1988; Zachara *et al.*, 1993) que han llevado a cabo sus experimentos en la especie ovina. Estos autores encuentran valores de 1,06 mg/Kg en el caso de los animales control y de 0,12 mg/Kg en los deficientes, en el caso del primero; y de 0,9 a 1,2 mg/Kg y, aproximadamente, 0,2 mg/Kg respectivamente en el caso de los deficientes, en el caso del segundo autor citado.

Por el contrario, los resultados expuestos por autores que han estudiado los efectos de la deficiencia en selenio en cerdos (Van Vleet *et al.*, 1981; Teige *et al.*, 1984) no concuerdan con los descritos por los autores anteriores. Probablemente ello se deba al uso de una especie animal distinta. El primer autor encontró valores de 0,15 mg/Kg en el hígado de cerdos mantenidos con un pienso normal; por su parte, el segundo encontró valores hepáticos de 0,05 mg/Kg en el caso de animales deficientes.

A pesar de las diferencias expuestas, se puede observar que las concentraciones de selenio en hígado en los animales deficientes en este nutriente, independientemente de la especie utilizada, se encuentra entre el 10 y el 15% de la concentración hallada en los hígados

| | Concentraciones hepáticas de selenio (mg/Kg) | |
|--------|--|----------------|
| | Deficientes | No deficientes |
| Máximo | 0,606 | 3,93 |
| Mínimo | < 0,015 | 0,94 |
| Media | 0,192 | 2,151 |

Tabla 7- Concentraciones hepáticas detectadas por espectrofotometría de absorción atómica (ITSEMAP AMBIENTAL S.A.)

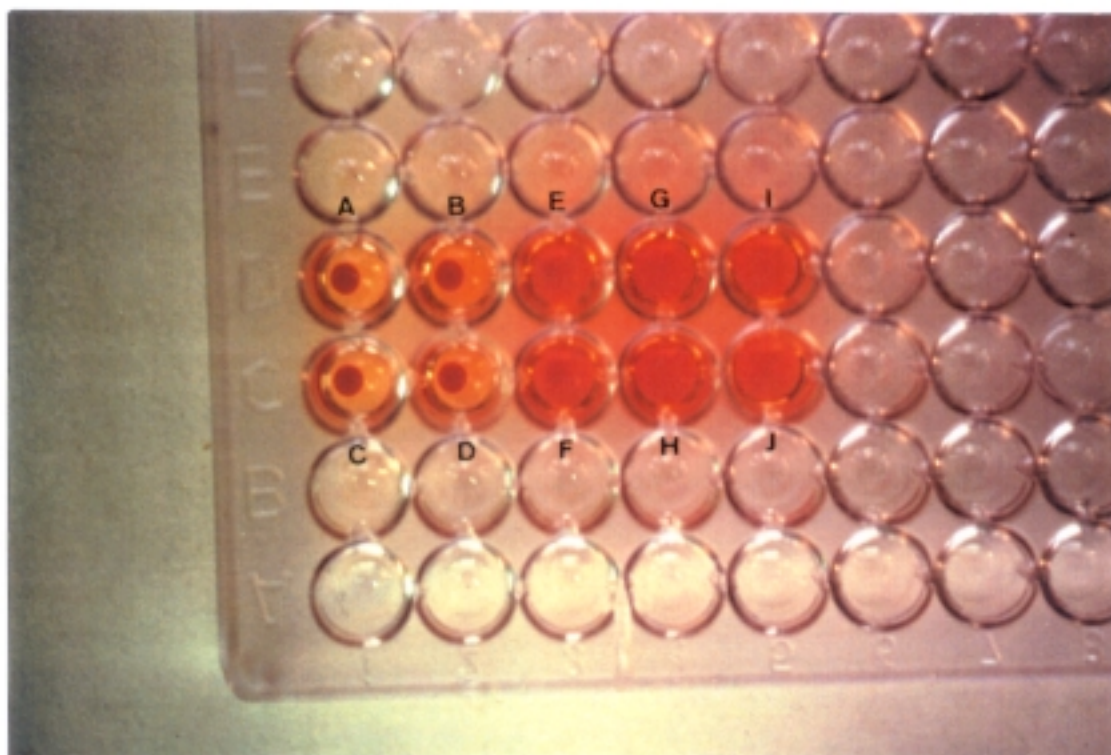


Imagen 2- Valoración de la deficiencia en selenio en función del grado de hemólisis:

- a- no deficiente 2 días;
- b- no deficiente 3 días;
- c y d- deficientes 1 día;
- e y f- deficientes 2 días;
- g y h- deficientes 3 días;
- i y j- deficientes 4 días.

de los animales utilizados como control, no superando estos niveles en ningún caso. En nuestros experimentos se obtienen proporciones similares, puesto que las concentraciones de selenio en hígado en el caso de los animales alimentados con la dieta deficiente es, en todos los casos, inferior al 10% de las concentraciones obtenidas en los controles. Por este motivo creemos que se pueden considerar como deficientes en selenio a los animales mantenidos con la dieta deficiente en selenio y vitamina E siguiendo la pauta establecida.

Estos valores se obtuvieron de manera constante tras 6 semanas de alimentación con dieta deficiente en selenio y vitamina E, momento en el que se daba inicio a los distintos experimentos. A modo de valoración cualitativa, y de fácil realización, establecimos una relación entre la concentración de selenio en el suero y la rapidez con que se hemolizaban los hematíes, tal y como se describe en el apartado 3.XVIII.

Con estas premisas se estableció la duración del aporte mínimo de pienso deficiente en selenio-vitamina E para obtener de forma segura ratones deficientes en seis semanas, lo que se confirmó cualitativamente (hemólisis) y cuantitativamente (determinación mediante espectrofotometría de absorción atómica) en cada experimento. El aporte de esta dieta deficiente continuó durante cada experimento sin que se produjeran variaciones significativas respecto a los valores obtenidos tras las 6 primeras semanas, por lo que podemos considerar que la tasa de selenio se mantuvo prácticamente uniforme a lo largo de todo el estudio.

Es importante señalar que la valoración histológica no reveló ninguna alteración muscular, ni en músculo esquelético ni en miocardio, como tampoco en ningún otro tejido de los animales deficientes. No se apreciaron, en consecuencia, diferencias entre los deficientes y no deficientes a este nivel.

En definitiva, los animales sometidos a dieta deficiente en selenio-vitamina E presentaron una deficiencia de selenio de tipo subclínico, únicamente detectable mediante valoración instrumental específica, y que, por tanto, puede calificarse como microdeficiencia.

4.II- ESTUDIOS DE MORTALIDAD

4.II.a- DL₅₀ VIA ENDOVENOSA

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8. Como puede apreciarse la mortalidad por vía endovenosa entre los animales deficientes es mayor que en el caso de los controles. En estos últimos es necesario alcanzar dosis de $10^{5.5}$ para poder llegar a observar algún muerto (40%); sin embargo, a partir de esa dosis se alcanza con cierta rapidez una mortalidad del 100% ($10^{6.5}$). Por su parte, en los deficientes se observa mortalidad desde dosis relativamente bajas ($10^{3.5}$).

Con los datos recogidos, y aplicando el método de Kärber (Schmidt y Emmons, 1989), podemos calcular una DL₅₀ para los animales deficientes de $10^{4.75}$ y de $10^{5.65}$ para los controles. Esta DL₅₀, en el caso de los controles, no difiere de la encontrada por otros autores (Vázquez-Boland y Berche, resultados no publicados) para esta misma cepa de *Listeria* y de ratones, por lo que la consideramos una buena referencia.

Los resultados obtenidos establecen una diferencia entre la DL₅₀ para deficientes y no deficientes de cerca de un logaritmo, lo que consideramos suficiente en cuanto a establecer un criterio de mayor o menor susceptibilidad por esta vía entre ambos grupos.

Las DL₅₀ obtenidas para cada grupo se usaron para los estudios de seguimiento de la infección por vía endovenosa.

4.II.b- MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA

Los resultados de este experimento se pueden observar en la tabla 9a. En ella se puede apreciar cómo la mayor mortalidad se produce con la dosis de 10^{10} Lm/ml, tanto en deficientes como en no deficientes (56,25 y 18,75% respectivamente), mientras que cuando se utiliza una dosis de 10^9 Lm/ml las mortalidades descienden entre un 59,25% en los deficientes (22,92%) y un 66,7% en los no deficientes (6,25%). La influencia de la dosis sobre la mortalidad es menor en el caso de los animales deficientes que en el de los no deficientes, debido a que en los primeros los mecanismos responsables de la respuesta inmune

| Dosis/ratón | Nº ratones | | Nº muertos | % muertos |
|-------------|-------------|---|------------|-----------|
| $10^{2,5}$ | Deficientes | 5 | 0 | 0 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| 10^3 | Deficientes | 5 | 0 | 0 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| $10^{3,5}$ | Deficientes | 5 | 1 | 20 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| 10^4 | Deficientes | 5 | 0 | 0 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| $10^{4,5}$ | Deficientes | 5 | 3 | 60 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| 10^5 | Deficientes | 5 | 2 | 40 |
| | Controles | 5 | 0 | 0 |
| $10^{5,5}$ | Deficientes | 5 | 4 | 80 |
| | Controles | 5 | 2 | 40 |
| 10^6 | Deficientes | 5 | 5 | 100 |
| | Controles | 5 | 4 | 80 |
| $10^{6,5}$ | Deficientes | 5 | 5 | 100 |
| | Controles | 5 | 5 | 100 |
| 10^7 | Deficientes | 5 | 5 | 100 |
| | Controles | 5 | 5 | 100 |

Deficientes: $7 - \{[(500/100) - 0,5] \times 0,5\} = 4,55 \Rightarrow DL50 = 10^{4,75}$

Controles: $7 - \{[(320/100) - 0,5] \times 0,5\} = 5,65 \Rightarrow DL50 = 10^{5,65}$

Tabla 8- Mortalidades obtenidas por vía endovenosa con Lm 4b en ratones deficientes y no deficientes.

| Dosis | Nº ratones | | Nº muertos | % muertos |
|-----------|-------------|----|------------|-----------|
| 10^{10} | Deficientes | 48 | 27 | 56,25 |
| | Controles | 48 | 9 | 18,75 |
| 10^9 | Deficientes | 48 | 11 | 22,92 |
| | Controles | 48 | 3 | 6,25 |

Tabla 9a- Mortalidad por vía oral con dosis única de Lm 4b.

| Dosis/T.b. | Nº ratones | | Nº muertos | % muertos |
|-------------------|-------------|----|------------|-----------|
| 10^9 4 días | Deficientes | 48 | 16 | 33,33 |
| | Controles | 48 | 7 | 14,58 |
| 10^9 7 días | Deficientes | 48 | 19 | 39,58 |
| | Controles | 48 | 10 | 20,83 |
| 10^8 10 días | Deficientes | 48 | 12 | 25 |
| | Controles | 48 | 8 | 16,67 |

Tabla 9b- Mortalidad por vía oral con dosis repetidas de Lm 4b.

se encuentran alterados, tal y cómo se expuso en el apartado 1.IX.d.

En cuanto a las diferencias entre las tasas de mortalidad obtenidas en deficientes y no deficientes, también se pueden apreciar diferencias importantes independientemente de la dosis utilizada. Así, la inoculación de dosis de 10^9 Lm/ml suponen una tasa de mortalidad inferior en un 72,7% en los no deficientes (6,25%) con respecto a la obtenida en los deficientes (22,92%); y con 10^{10} Lm/ml esa reducción es del 66,7% (18,75 y 56,25% respectivamente). Todo ello parece representar una posible influencia de la deficiencia en selenio en la susceptibilidad a la listeriosis, tal y como se discutirá en el apartado 4.X.

4.II.c- MORTALIDAD POR VIA ORAL CON DOSIS REPETIDAS

Este experimento fue enfocado a estudiar el efecto de dosis repetidas en la mortalidad por vía oral. Como puede apreciarse en la tabla 9b, existe una relación directa entre la mortalidad y el número de repeticiones de una misma dosis. Así, la mayor mortalidad, tanto en deficientes como en no deficientes, se obtiene dosis de 10^9 Lm/ml durante 7 días, 39,58 y 20,83% respectivamente. Cuando la misma dosis se administra durante 4 días se produce una reducción de la mortalidad hasta valores de 33,33% en los deficientes y 14,58% en los no deficientes. El empleo de una dosis menor (10^8 Lm/ml) durante un período de tiempo de 10 días, produce una menor mortalidad en ambos grupos, pero si en los deficientes la mortalidad permanece por debajo de la obtenida con 10^9 Lm/ml durante 4 y 7 días (25, 33,33 y 39,58% respectivamente), no ocurre igual en el caso de los no deficientes, en los que esta mortalidad es superior a la encontrada con 10^9 Lm/ml durante 4 días (16,67 y 14,58% respectivamente), aunque esta mínima diferencia (aproximadamente 2 logaritmos) no parece ser relevante.

A nuestro juicio, estos resultados sugieren la existencia de un efecto acumulativo, en el sentido de que una dosis de 10^8 Lm/ml durante 10 días produce mayor mortalidad en ambos grupos que una única de 10^9 Lm/ml, siendo idéntica la dosis total inoculada. Esto es especialmente marcado en el caso de los no deficientes, con mortalidades de 6,25% (1×10^9 Lm/ml) y 16,67 (10×10^8 Lm/ml), lo que representa un incremento de la mortalidad de un 166,72%.

En el caso de las dosis repetidas en el tiempo, las diferencias entre deficientes y no deficientes descienden a medida que aumenta el número de repeticiones, así con 10^9 Lm/ml durante 4 días se obtiene un incremento de la mortalidad de 128,6% en el caso de los deficientes, si aumentamos a 7 días el período de inoculación ese incremento es de tan sólo un 90%, y si utilizamos 10^8 Lm/ml durante 10 días el incremento no supera el 50%.

Los estudios experimentales sobre listeriosis que utilizan la inoculación por vía oral se sirven por lo general de dosis muy elevadas, del orden de 10^{10} ó 10^9 Lm/ml (Golnazarian *et al.*, 1989; Notermans y Chakraborty, 1992), en tomas únicas como pauta más extendida. Este sistema permite reproducir, de forma más o menos constante, la infección e incluso producir la enfermedad clínica. Nuestros resultados confirman la producción de la enfermedad mediante el empleo de dosis altas por vía oral, pero además, sugieren la posible existencia de un efecto acumulativo con el que se obtienen mortalidades superiores utilizando la misma dosis total pero fraccionada en varias tomas.

Este fenómeno acumulativo ya ha sido descrito por nuestro grupo en referencia a la respuesta serológica frente a inoculaciones con *L. monocytogenes* por vía oral a dosis de incluso 10^3 Lm/ml (López *et al.*, 1992). En este estudio se demostró el desarrollo de una tasa detectable de aglutininas mediante inoculaciones repetidas de la citada dosis. Esta respuesta inmune revela un contacto entre *L. monocytogenes* y el sistema inmune del hospedador, y, por tanto, de una cierta diseminación extraintestinal, controlada por el hospedador, en razón del bajo número de *L. monocytogenes* que lo logran.

La posible existencia de un efecto acumulativo podría tener importancia desde un punto de vista epidemiológico y experimental. En el primer caso sería relevante en cuanto a que en condiciones naturales la infección se produce a partir de alimentos contaminados en los que las tasas de *L. monocytogenes* raramente alcanzan los valores empleados en estudios experimentales (10^5 ensilado). Sin embargo, un aporte reiterado podría traducirse en el desarrollo de la enfermedad aunque el número de *L. monocytogenes* en el alimento sea relativamente baja. En cuanto a las repercusiones en el ámbito experimental, podría plantearse la necesidad de establecer pautas de inoculación en base a aportes diarios reducidos, pero prolongados durante un periodo de tiempo relativamente largo.

Podría especularse con la posibilidad de que aportes sucesivos de listerias pudieran ayudar a dicho microorganismo a soslayar el efecto competitivo de las restantes bacterias intestinales. De hecho, *L. monocytogenes* ha sido descrita como una pobre competidora a este respecto (Zachar y Savage, citado por Golnazarian *et al.* 1989; y por Marco *et al.*, 1992b), e incluso se ha comprobado cómo *L. monocytogenes* únicamente produce lesiones intestinales tras un brusco cambio del ambiente gastrointestinal (Rácz citado por Marco *et al.*, 1992b). De igual forma el posible efecto negativo del pH gástrico (Schlech, 1990) podría verse disminuido en base a aportes repetidos de *L. monocytogenes*.

La influencia real de estos factores debe, en cualquier caso, ser contrastada mediante nuevos estudios encaminados específicamente a valorar estos hechos, ya que nuestros datos no son determinantes a este respecto.

Para finalizar este apartado, queremos hacer referencia al hecho de que en ninguno de los experimentos de dosis única los animales mostraron manifestaciones clínicas antes de una semana post-inoculación, lo que parece apoyar la teoría de que, por vía oral, *Listeria* necesita un cierto tiempo durante el cual se multiplicaría en epitelio intestinal hasta alcanzar el número necesario para atravesar la barrera intestinal y llegar a sus órganos dianas; ese tiempo podría verse afectado por la dosis utilizada; así, la aparición de signos clínicos es anterior en 24 horas con 10^{10} que con 10^9 Lm/ml, lo que parece estar en consonancia con que la infección por listerias por vía oral es dosis dependiente (Schlech, 1990).

4.III- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ENDOVENOSA

4.III.a- DOSIS $10^{4,5}$

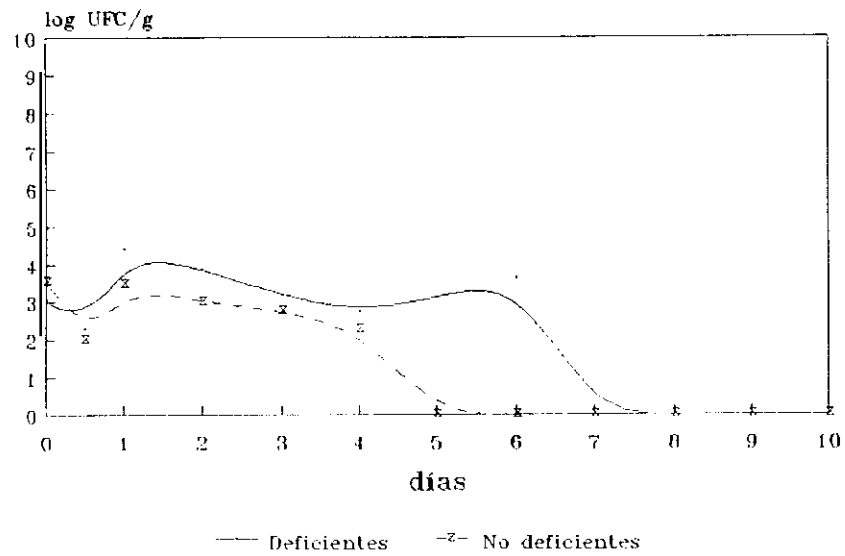
Esta dosis fue utilizada por ser la más aproximada a la DL_{50} de los ratones deficientes que pudimos obtener, ya que la pauta seguida tan sólo nos permite ajustarnos a medio logaritmo. En la tabla 10 pueden apreciarse los resultados obtenidos de los recuentos de *L. monocytogenes* en hígado y bazo, tanto en los animales deficientes como en los controles.

Podemos observar cómo los recuentos en bazo son muy similares en ambos grupos a lo largo de casi toda el experimento. En primer lugar se produce un aumento de los

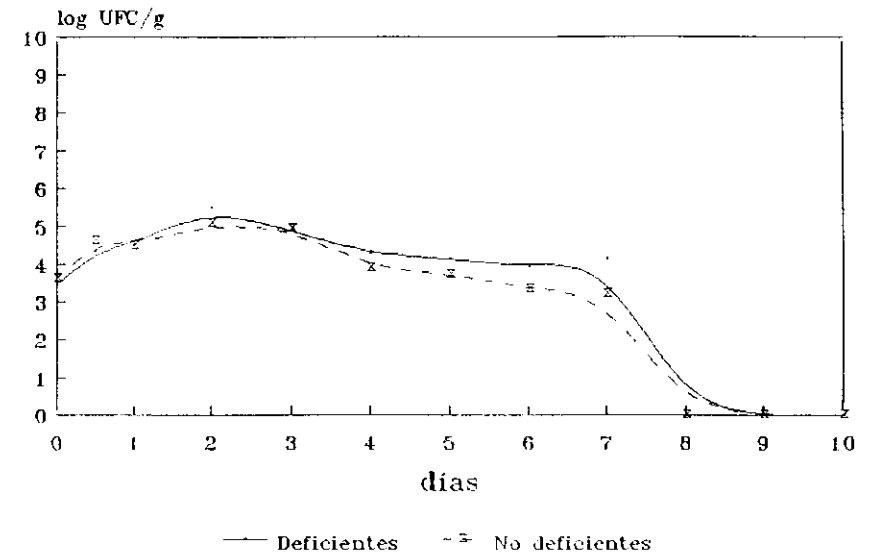
| TPI | Deficientes | | No deficientes | |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Hígado | Bazo | Hígado | Bazo |
| 30 m | $1,12 \times 10^3$ | $2,88 \times 10^3$ | $3,8 \times 10^3$ | $4,2 \times 10^3$ |
| 12 h | 2×10^2 | $2,37 \times 10^4$ | 1×10^2 | $4,25 \times 10^4$ |
| 1 d | $2,73 \times 10^4$ | $3,45 \times 10^4$ | $3,07 \times 10^3$ | $3,23 \times 10^4$ |
| 2 d | $7,82 \times 10^3$ | $3,18 \times 10^5$ | $1,02 \times 10^3$ | $1,21 \times 10^5$ |
| 3 d | $1,57 \times 10^3$ | $7,54 \times 10^4$ | 6×10^2 | $9,12 \times 10^4$ |
| 4 d | $5,5 \times 10^2$ | $1,97 \times 10^4$ | 2×10^2 | $8,3 \times 10^3$ |
| 5 d | $1,32 \times 10^3$ | $1,45 \times 10^4$ | 0 | $5,65 \times 10^3$ |
| 6 d | $4,4 \times 10^3$ | $8,55 \times 10^3$ | 0 | $2,37 \times 10^3$ |
| 7 d | 0 | $1,4 \times 10^4$ | 0 | $1,65 \times 10^3$ |
| 8 d | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 10- Resultado de los recuentos en hígado y bazo tras inoculación intravenosa con $10^{4,5}$ Lm.

a-Hígado



b- Bazo



Gráf. 1- Dinámica de los recuentos en ratones inoculados con $10^{4.5}$ de Lm 4b por vía intravenosa.

recuentos hasta el día 2 pi, y a partir de ese momento se produce un descenso en los mismos hasta desaparecer el día 8 en ambos casos (gráfica 1b).

En líneas generales, nuestros resultados coinciden con los expuestos por Goosens *et al.* (1988), según los cuales los recuentos obtenidos a partir del bazo de ratones susceptibles y resistentes a la listeriosis eran prácticamente iguales. Este y otros autores citados por él, opinan que esto se debe a que en el bazo no se expresa una rápida resistencia a la listeriosis, apareciendo ésta a partir del día 4; opinión que parece confirmarse por los trabajos de Conlan y North (1994), en los que se afirma que los neutrófilos no lisan las células infectadas en el bazo como parecen hacer en el hígado, quedando en este órgano las listerias a resguardo de las células fagocíticas. Esto coincide con por lo expuesto por otros autores (Archinal y Wilder, 1988a; Hof y Hefner, 1988; Cossart y Mengaud, 1989), quienes afirman que tras una inoculación intraperitoneal o intravenosa se produce un aumento de los recuentos en bazo hasta el día 3 pi, produciéndose a continuación un descenso de esos recuentos que llevan hasta el control de la infección por parte del hospedador. La aparición más lenta de esa resistencia parece, asimismo, confirmarse por el hecho de que en nuestros dos grupos los recuentos de listerias en este órgano no comienza a descender hasta después del día 2.

En el hígado, el número de bacterias aisladas a los 30 minutos pi fue mayor en los controles que en los deficientes, a continuación se produce un descenso en el número de los recuentos obtenidos en ambos grupos a las 12 horas pi, para a partir de ese momento aumentar el día 1 pi; este aumento es mayor en el caso de los deficientes que en el de los no deficientes (graf. 1a). Desde el día 1 pi los recuentos comienzan a descender hasta desaparecer en los no deficientes el día 5 pi; por su parte, en los deficientes los recuentos descienden levemente hasta producirse un nuevo incremento el día 6 pi, tras el que desaparecen el día 7 pi. Estos resultados son semejantes a los expuestos por otros autores (Cossart y Mengaud, 1989), según los que tras una inoculación intravenosa se produce un aumento del número de listerias en hígado hasta el día 2 ó 3 pi, a partir de los que se produce una inactivación de las bacterias y la recuperación del hospedador.

En los deficientes se observan mayores recuentos en hígado, así como un mayor tiempo de permanencia de los microorganismos en éste, probablemente debido a un fallo en la respuesta inmune tal y como discutiremos en el apartado 4.X. Por otra parte, ese mayor

tiempo de permanencia aumenta las posibilidades de generalización y de mortalidad, lo que podría explicar las diferencias de mortalidad observadas con esta dosis, 60 y 0% en deficientes y no deficientes respectivamente (tabla 8).

Otro punto a destacar es la disminución de listerias observado a las 12 horas pi en los dos grupos. Consideramos que este descenso se debe a la actuación de los neutrófilos durante las primeras horas de la infección hasta la llegada de los macrófagos y linfocitos T, tal y como apuntan algunos autores (Conlan y North, 1991, 1993, 1994). Este descenso es más enérgico en el caso de los animales controles que en los deficientes, lo cual, probablemente, sea debido a una menor eficacia de estas células en los últimos a la hora de poder instaurar una correcta respuesta a la infección. Menor eficacia que debemos asumir sea debida al único factor que diferencia ambos grupos, esto es la deficiencia en selenio y vitamina E, tal como se refleja en 4.X.

En cuanto al aumento observado en los recuentos a partir de hígado de los animales deficientes los días 5 y 6 (gráfica 1a), y a la luz de los resultados obtenidos con la dosis de $10^{5.5}$, y que se exponen en el siguiente apartado, consideramos que podrían deberse a una segunda generalización a partir de los focos producidos en la infección inicial.

En líneas generales, nuestros resultados en el hígado también parecen estar en consonancia con los expuestos por Goosens *et al.* (1988), quien afirma que los recuentos en hígado fueron mayores en el caso de los ratones sensibles a la listeriosis que en los resistentes. Además, este autor también señala que en los animales resistentes la sensibilización de los linfocitos T se produce en un tiempo menor que en los sensibles. La desaparición más rápida de las listerias en los no deficientes podría deberse a esta sensibilización más temprana de dichos linfocitos.

Observando las gráficas 1a y b, podemos ver cómo las listerias tardan más tiempo en desaparecer del bazo que del hígado, observación realizada asimismo por otros autores (Hof y Hefner, 1988; Cossart y Mengaud, 1989), debido a una mayor rapidez en el establecimiento de los mecanismos de defensa en el hígado que en el bazo (Goosens *et al.*, 1988; Cossart y Mengaud, 1989), a un mayor tropismo de *L. monocytogenes* por el bazo (Hof y Hefner, 1988), o a que los neutrófilos no actúan de la misma forma en ambos órganos (Conlan y

North, 1994).

Los resultados estadísticos confirman la existencia de diferencias significativas en los recuentos obtenidos a partir de hígado entre los deficientes y no deficientes ($P < 0,05$).

4.III.b- DOSIS $10^{5,5}$

Esta dosis se escogió en virtud de ser la más aproximada a la DL_{50} calculada para los ratones no deficientes que podíamos obtener mediante las pautas utilizadas. La tabla 11 muestra los resultados de los recuentos de *L. monocytogenes* a partir hígado y bazo de los grupos control y deficiente, inoculados con esta dosis.

Tal y como puede verse en la citada tabla, a los 30 minutos pi los recuentos son ligeramente superiores en el bazo de los controles que en el de los deficientes. Sin embargo, a partir de ese momento existen diferencias entre ambos grupos, al producirse un aumento de las listerias aisladas hasta el día 1 pi, tal y como ocurriera con la dosis de $10^{4,5}$, siendo éste mayor en el caso de los deficientes. El aumento de los recuentos en el bazo durante las primeras 24 horas parece estar en consonancia, asimismo, con lo expuesto por Archinal y Wilder (1988a).

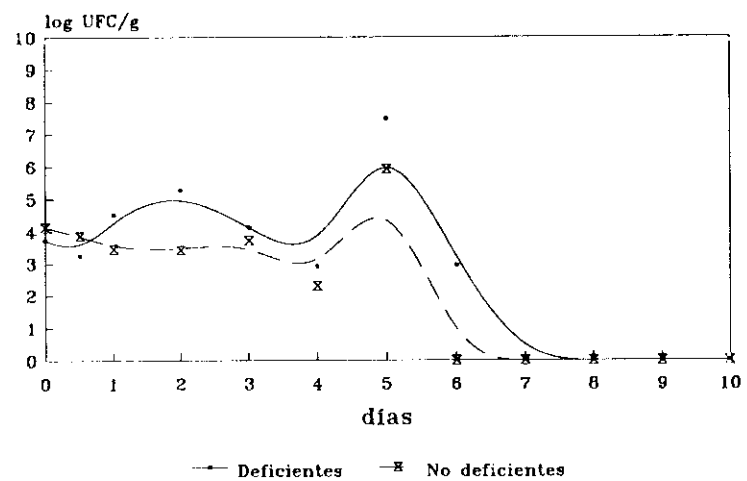
Entre los días 2 y 4 pi se produce un leve descenso en los recuentos de ambos grupos, aunque las diferencias entre ellos son de casi un logaritmo (gráfica 2b). El día 5 pi se produce un segundo aumento, mucho más acusado en los deficientes que en los no deficientes, para a partir de entonces descender hasta desaparecer en ambos casos el día 8 pi. Este segundo aumento parece confirmar una reactivación de la infección inicial, que sería controlada mucho más rápidamente. Es importante señalar que la existencia de ese segundo aumento de los recuentos no aparece reflejada en ninguna de las citas bibliográficas consultadas, ya que la mayoría de los estudios suelen acabar el día 4 pi. Asimismo, es sorprendente la aparición de este pico cuando los recuentos se encuentran descendiendo, sin que hayamos encontrado otra explicación que una posible liberación de listerias a partir de focos donde se hubiesen acantonado durante la infección inicial.

Estos resultados difieren de los observados por Goosens *et al.* (1988), quienes no

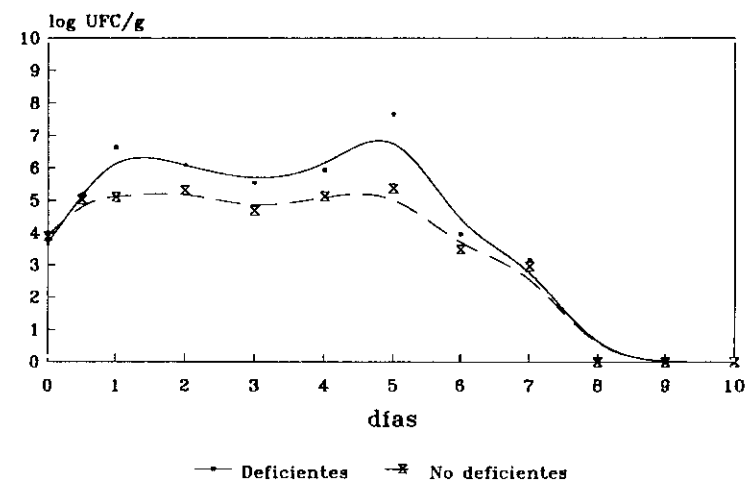
| TPI | Deficientes | | No deficientes | |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Hígado | Bazo | Hígado | Bazo |
| 30 m | $5,25 \times 10^3$ | $4,75 \times 10^3$ | $1,36 \times 10^4$ | $7,85 \times 10^3$ |
| 12 h | $1,78 \times 10^3$ | $1,5 \times 10^2$ | $7,27 \times 10^3$ | $1,07 \times 10^4$ |
| 1 d | $3,32 \times 10^4$ | $4,36 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^3$ | $1,29 \times 10^5$ |
| 2 d | $1,9 \times 10^4$ | $1,24 \times 10^6$ | $2,62 \times 10^3$ | $2,09 \times 10^5$ |
| 3 d | $1,36 \times 10^4$ | $3,59 \times 10^5$ | $5,12 \times 10^3$ | $4,95 \times 10^4$ |
| 4 d | 8×10^2 | $8,65 \times 10^5$ | 2×10^2 | $1,34 \times 10^5$ |
| 5 d | $3,2 \times 10^7$ | $4,52 \times 10^7$ | $8,77 \times 10^5$ | $2,35 \times 10^5$ |
| 6 d | $8,85 \times 10^2$ | $9,2 \times 10^3$ | 0 | 3×10^3 |
| 7 d | 0 | $1,37 \times 10^3$ | 0 | 9×10^2 |
| 8 d | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 11- Resultado de los recuentos en hígado y bazo tras inoculación intravenosa con $10^{5,5}$ Lm

a- Hígado



b- Bazo



Gráf. 2- Dinámica de los recuentos en ratones inoculados con $10^{5.5}$ de Lm 4b por vía intravenosa.

encontraron diferencias en ratones sensibles y resistentes entre los recuentos durante las 72 primeras horas tras inocular hasta 9×10^5 *L. monocytogenes*/ratón por esta vía. Quizás esa diferencia sea debido, tal y como referimos anteriormente, a una mayor resistencia de la cepa de ratones utilizada por nosotros a la listeriosis.

En el hígado se repite la observación inicial hecha en el bazo, esto es, el número de bacterias aisladas a los 30 minutos es mayor en los controles que en los deficientes. Asimismo, se observa una reducción del número de *L. monocytogenes* aislado a las 12 horas; reducción ésta, aunque muy similar, ligeramente superior en los deficientes que en los controles. A las 24 horas ese número es ya un logaritmo mayor en los segundos (graf. 2a). Por otra parte, mientras que en los controles los recuentos se mantienen prácticamente constantes hasta el día 3, e incluso descienden ligeramente el día 4, en el caso de los deficientes todavía aumentan un logaritmo antes de iniciar ese descenso. El día 5 puede observarse cómo se produce un aumento de los recuentos de listerias aisladas, muy similar al observado en el bazo, y que podría responder de igual forma a una reactivación de la infección inicial. Este aumento parece ser más importante que el observado en el bazo, puesto que en ambos grupos el aumento en el caso del hígado es de alrededor de 4 logaritmos, mientras que en el bazo es aproximadamente 2 logaritmos en los deficientes y de menos de uno en los controles (graf. 2a y b).

Por último, hemos de destacar que los deficientes tardan únicamente 24 horas más que los controles en eliminar las listerias de hígado, lo que podría tal vez ser debido a que a dosis próximas a la DL_{50} las diferencias entre deficientes y no deficientes no serían apreciables, y el comportamiento de ambos grupos sería muy similar, lo que implicaría que existe un número de listerias lo suficientemente elevado para rebasar la capacidad de respuesta inmune, esté o no alterada.

La reactivación de la infección observada, parece ser dependiente de la dosis, apareciendo a partir de dosis letales y no siendo observada en dosis subletales (tabla 10). Esta sería la causa por la que no se observa en los no deficientes con la dosis de $10^{4.5}$, que para este grupo es subletal, y sí en cambio al utilizar la dosis de $10^{5.5}$, lo que también parece confirmar las diferencias de mortalidad encontradas en ambos casos (tabla 8).

La existencia de esta reactivación y las diferencias de recuentos de casi 2 logaritmos, podría relacionarse directamente con las diferencias en cuanto a mortalidad observadas con esta dosis en animales deficientes y no deficientes, que son del 80 y el 40% respectivamente. Además ello implicaría, en nuestra opinión, que los estudios sobre la listeriosis deberían tener una duración suficiente (en nuestro caso 10 días pi) para poder contemplar este fenómeno.

Tal y como reflejamos en el caso anterior, se observa cómo existe una mayor tardanza en desaparecer las listerias del bazo que del hígado, y que lógicamente tendría la misma explicación expuesta en el apartado anterior.

Nuevamente, los resultados estadísticos confirman la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos de animales ($P < 0,05$) con la dosis utilizada de $10^{5.5}$ por vía iv.

4.IV- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON DOSIS UNICA

4.IV.a- CON *LISTERIA MONOCYTOGENES* 4b

Los resultados obtenidos del aislamiento en órganos de listerias inoculadas por vía oral en ratones deficientes y no deficientes son los expuestos en las tablas 12 y 13. En ellas se puede observar un retraso de 24 horas con respecto a la vía intravenosa para poder aislarlas de hígado y bazo; ese tiempo podría ser el necesario para traspasar la barrera intestinal, alcanzar y, eventualmente, multiplicarse en los órganos linfoides regionales, a partir de donde llegan a hígado y bazo, tal y como se explicó en el apartado 4.II.c.

En la mucosa del tracto digestivo únicamente se encontraron lesiones en las placas de Peyer. En éstas se observó, tanto lesión evidente como bacterias hasta el día 6 pi en los deficientes. Las lesiones más graves mostraron, de forma predominante, una reacción inflamatoria purulenta, que afectaba siempre a las áreas cúpula de las placas de Peyer, entre el epitelio y los folículos linfoides (imágenes 7, 8, 9, 10 y 11). En algunos casos este epitelio de las Placas de Peyer se presentaba ulcerado. Las lesiones encontradas en los animales no deficientes fueron muy similares a las descritas en los deficientes, aunque la inflamación fue más ligera, y se circunscribió únicamente a los días 2 y 3 pi.

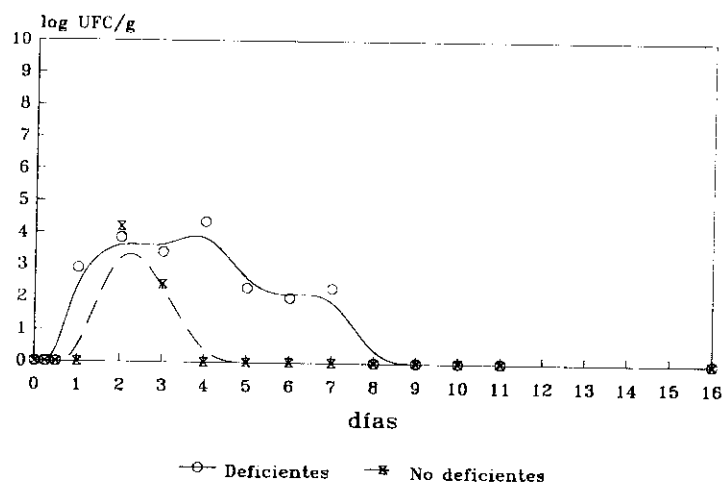
| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 30 m | 0 | 0 | 0 | NR | 2,26x10 ⁵ | NR | NR | NR | NR |
| 6 h | 0 | 0 | 0 | 1,68x10 ⁴ | 4,16x10 ⁴ | 1,25x10 ⁵ | 8,3x10 ³ | 7,3x10 ⁷ | 4,03x10 ⁹ |
| 12 h | 0 | 0 | 1x10 ³ | 2,19x10 ⁴ | 3,92x10 ⁴ | 3,8x10 ⁵ | 1,73x10 ⁵ | 1,89x10 ⁵ | 1,4x10 ⁹ |
| 24 h | 8x10 ² | 4x10 ² | 6,95x10 ³ | 1,78x10 ⁴ | 5,8x10 ⁴ | 1,75x10 ³ | 1,14x10 ³ | 1,59x10 ⁴ | 6,95x10 ⁷ |
| 2 d | 7,2x10 ³ | 4,85x10 ³ | 4,9x10 ⁴ | 3,98x10 ⁶ | 4,8x10 ⁴ | 1,4x10 ⁴ | 2,5x10 ² | 2,66x10 ⁵ | 3,06x10 ⁸ |
| 3 d | 2,6x10 ³ | 9,6x10 ³ | 1,99x10 ⁴ | 3,25x10 ⁴ | 6,86x10 ⁴ | 4,9x10 ³ | 6x10 ² | 5,5x10 ⁴ | 1,7x10 ⁷ |
| 4 d | 2,23x10 ⁴ | 1,66x10 ⁴ | 1,7x10 ³ | 1,85x10 ⁴ | 9,5x10 ⁴ | 9,28x10 ³ | 6,35x10 ⁴ | 7,53x10 ⁵ | 1,58x10 ⁸ |
| 5 d | 2x10 ² | 1x10 ² | 0 | 3,5x10 ² | 1,23x10 ⁴ | 1,45x10 ³ | 5,5x10 ² | 1,53x10 ⁵ | 4,6x10 ⁶ |
| 6 d | 1x10 ² | 1x10 ² | 0 | 3x10 ² | 7,8x10 ³ | 3,8x10 ³ | 1,92x10 ⁴ | 5,92x10 ⁵ | 1,87x10 ⁷ |
| 7 d | 2x10 ² | 1x10 ² | 0 | 0 | 1,9x10 ³ | 2,95x10 ³ | 4,89x10 ⁶ | 2,6x10 ⁴ | 6,5x10 ⁷ |
| 8 d | 0 | 3x10 ³ | 0 | 0 | 4x10 ² | 1,35x10 ³ | 3,25x10 ⁴ | 1,6x10 ⁴ | 1,09x10 ⁵ |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3x10 ³ | 3x10 ⁴ |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1x10 ² | 2,85x10 ³ |
| 11 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,98x10 ² | 1,58x10 ³ |
| 16 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 12- Resultado de los recuentos en los distintos órganos de ratones deficientes inoculados por vía oral con una única dosis (10⁹ Lm/ml).

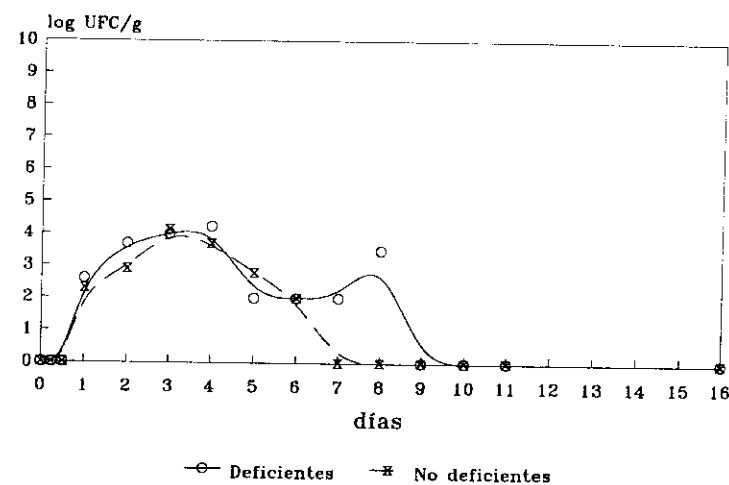
| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 30 m | 0 | 0 | 0 | NR | $2,99 \times 10^4$ | NR | NR | NR | NR |
| 6 h | 0 | 0 | 0 | $7,72 \times 10^3$ | $3,53 \times 10^4$ | $7,5 \times 10^5$ | $3,56 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^8$ |
| 12 h | 0 | 0 | 1×10^2 | $9,27 \times 10^3$ | $8,9 \times 10^3$ | $2,13 \times 10^5$ | $7,45 \times 10^5$ | 2×10^3 | $1,95 \times 10^8$ |
| 24 h | 0 | 2×10^2 | 0 | $4,03 \times 10^4$ | $1,57 \times 10^5$ | $1,07 \times 10^6$ | $1,33 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^5$ | $4,27 \times 10^7$ |
| 2 d | $1,61 \times 10^4$ | 8×10^2 | $2,39 \times 10^4$ | $2,21 \times 10^6$ | $5,6 \times 10^3$ | $1,13 \times 10^4$ | $6,97 \times 10^4$ | $1,7 \times 10^4$ | $3,77 \times 10^8$ |
| 3 d | $2,5 \times 10^2$ | $1,35 \times 10^4$ | $3,1 \times 10^4$ | $6,3 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^4$ | $1,29 \times 10^4$ | $3,1 \times 10^4$ | $2,35 \times 10^3$ | $1,77 \times 10^6$ |
| 4 d | 0 | $4,9 \times 10^3$ | 5×10^2 | $2,7 \times 10^3$ | $7,2 \times 10^3$ | $1,15 \times 10^5$ | $8,25 \times 10^3$ | $1,2 \times 10^4$ | $1,78 \times 10^6$ |
| 5 d | 0 | 6×10^2 | 0 | 9×10^2 | $6,5 \times 10^2$ | 1×10^2 | 1×10^2 | 1×10^3 | $1,89 \times 10^4$ |
| 6 d | 0 | 1×10^2 | 0 | 0 | $5,8 \times 10^3$ | $3,2 \times 10^3$ | $3,08 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^3$ | $1,93 \times 10^6$ |
| 7 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $2,3 \times 10^3$ | $3,53 \times 10^4$ | $1,66 \times 10^5$ | $2,52 \times 10^5$ |
| 8 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1×10^2 | 1×10^2 | 2×10^3 |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $4,17 \times 10^3$ | 4×10^2 | $7,15 \times 10^4$ |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4×10^2 | 0 | $6,15 \times 10^3$ |
| 11 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 13- Resultado de los recuentos en los distintos órganos de ratones no deficientes inoculados por vía oral con una única dosis (10^9 Lm/ml).

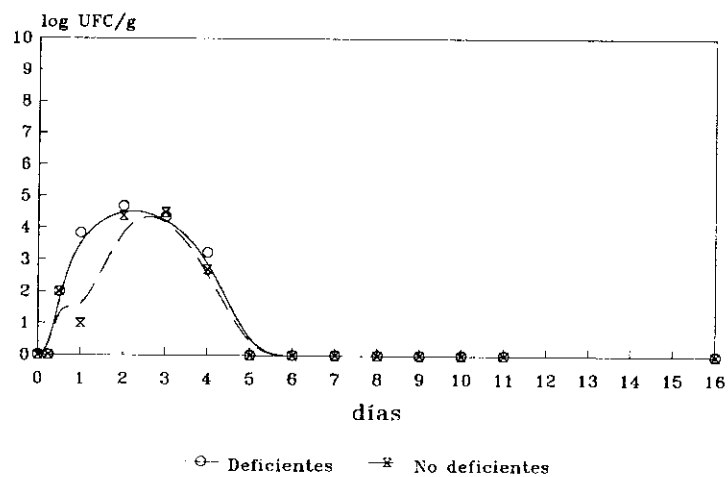
a- Hígado



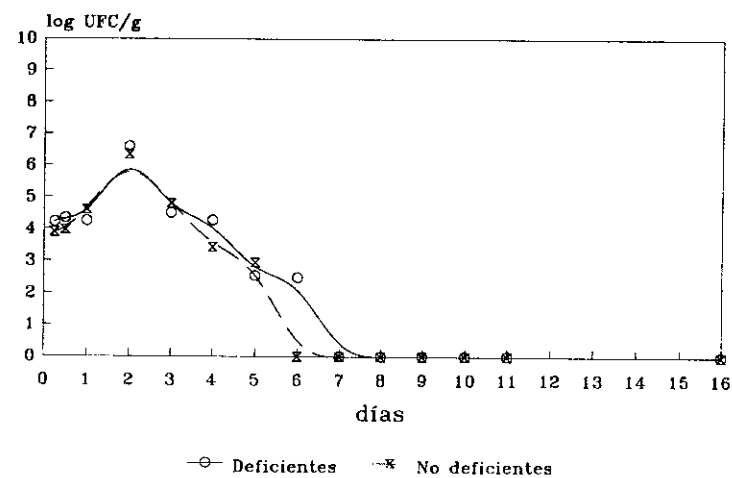
b- Bazo



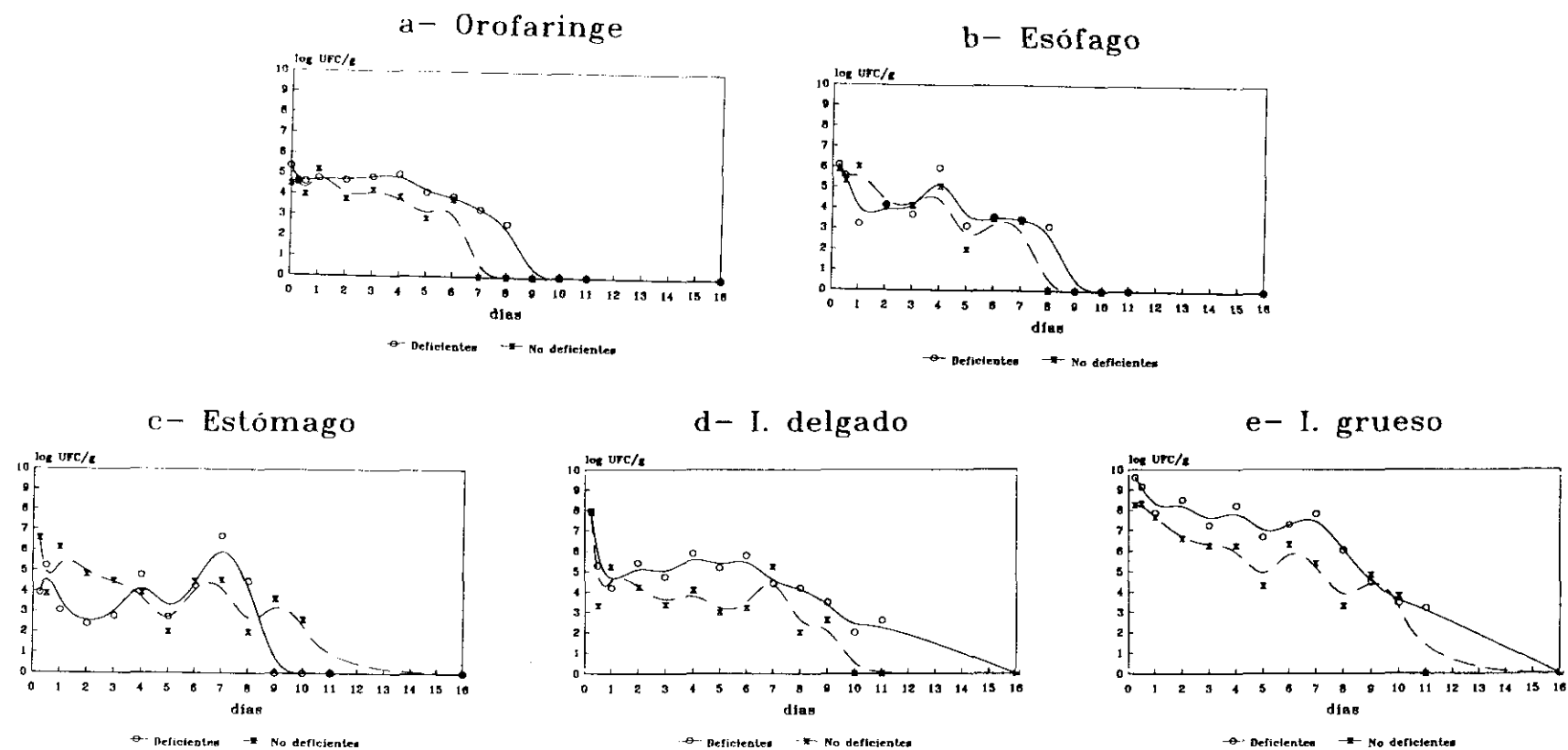
c- Ganglio submandibular



d- Ganglio mesentérico



Gráf. 3- Dinámica de los recuentos en órganos internos de ratones inoculados por vía oral con dosis única de Lm 4b (10^9 Lm/ml).



Gráf. 4- Dinámica de los recuentos a lo largo del tubo digestivo tras inoculación oral con dosis única de Lm 4b (10^9 Lm/ml).

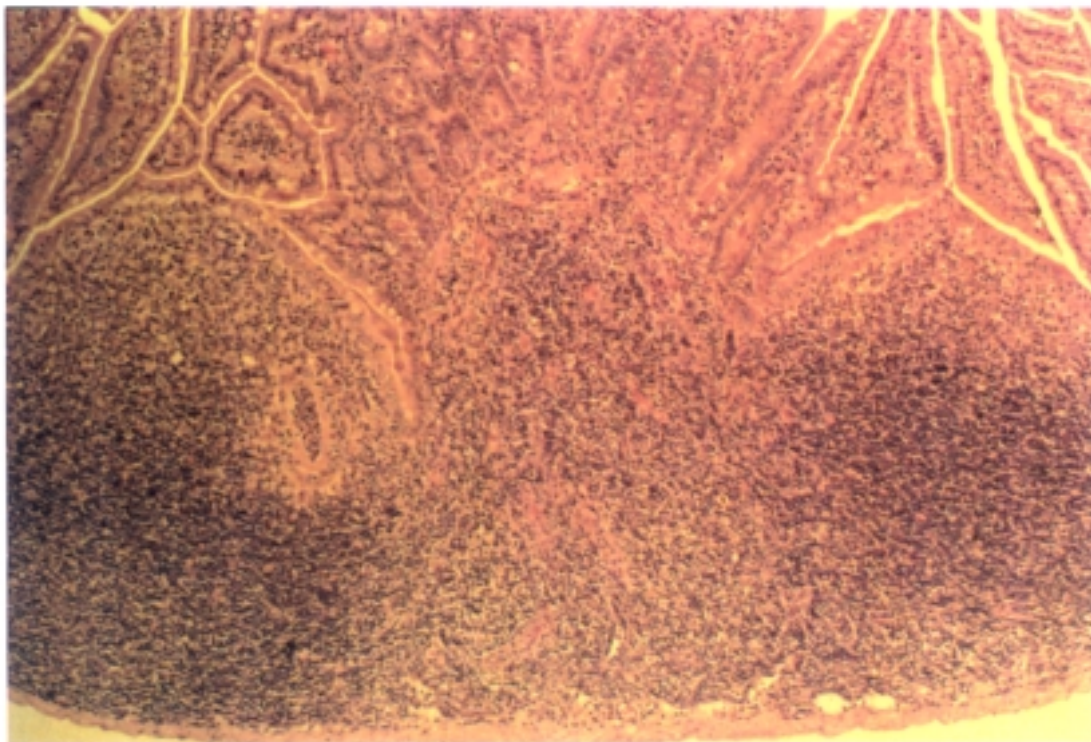


Imagen 3- Aspecto normal de una placa de Peyer en un no deficiente (12 hpi).

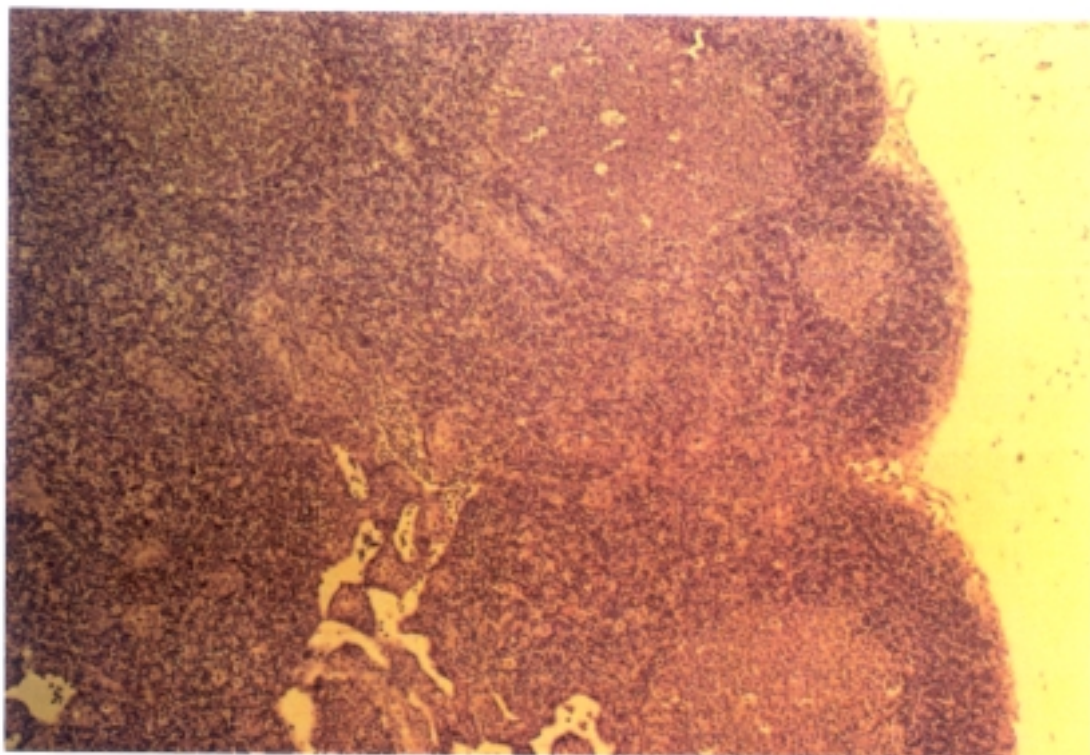


Imagen 4- Aspecto normal de un ganglio mesentérico en un no deficiente (1 dpi).

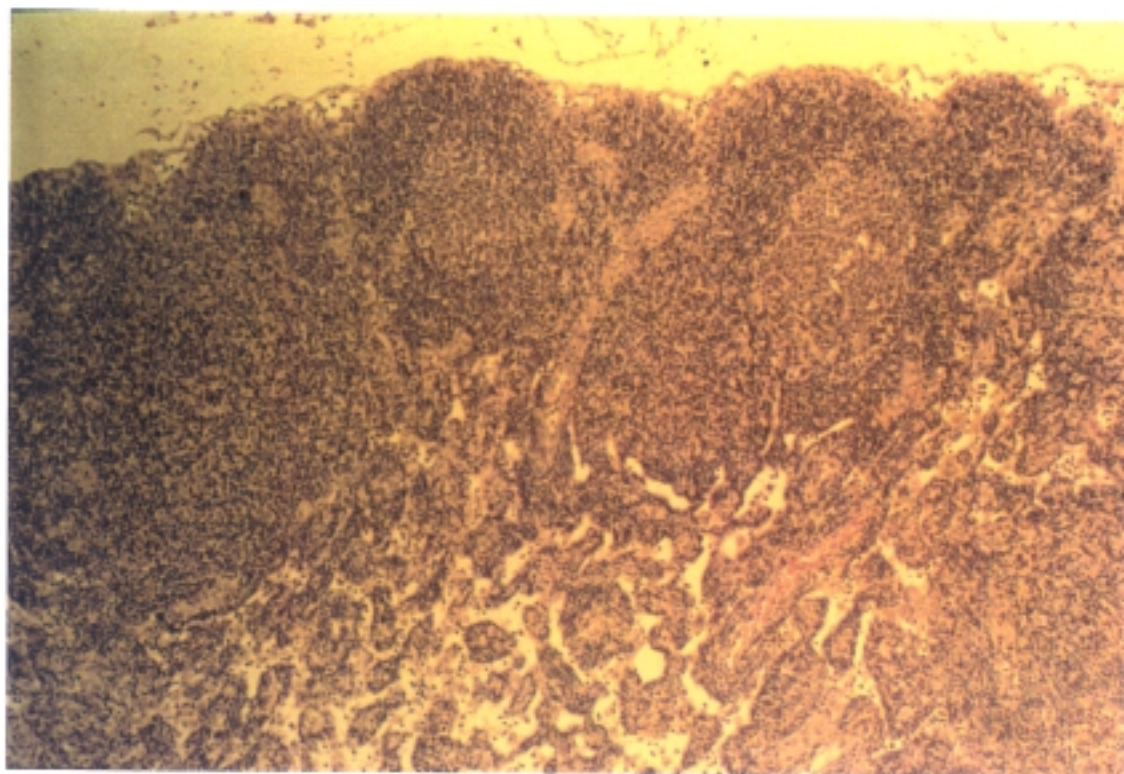


Imagen 5- Aspecto normal de un ganglio mesentérico en un deficiente (1 dpi).

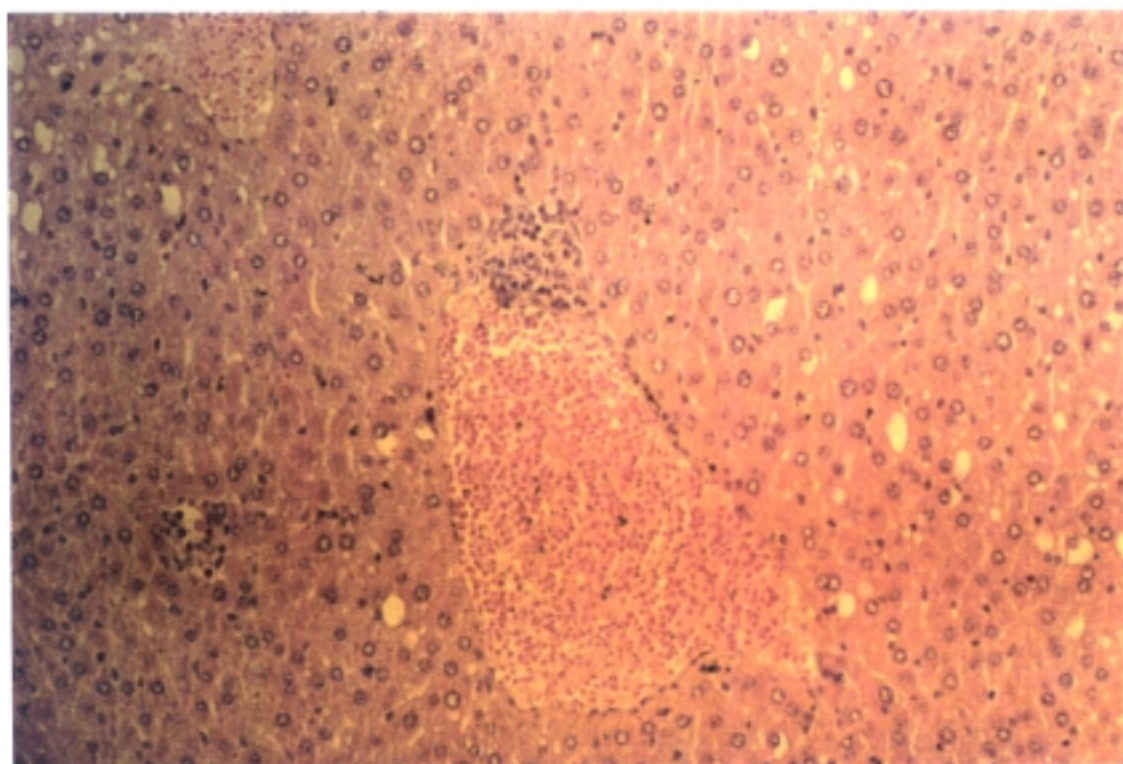


Imagen 6- Lesión hepática leve focal en un deficiente (1 dpi).

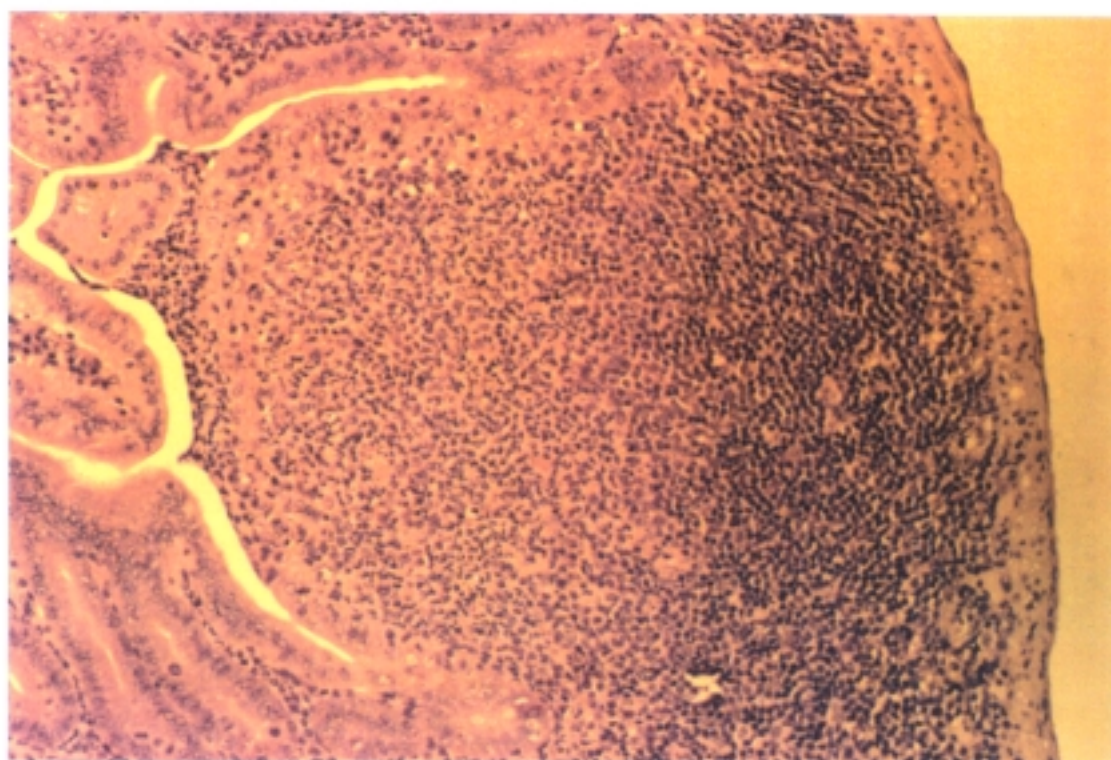


Imagen 7- Inflamación purulenta circunscrita a las áreas cúpula de las Placas de Peyer en un deficiente (1 dpi).

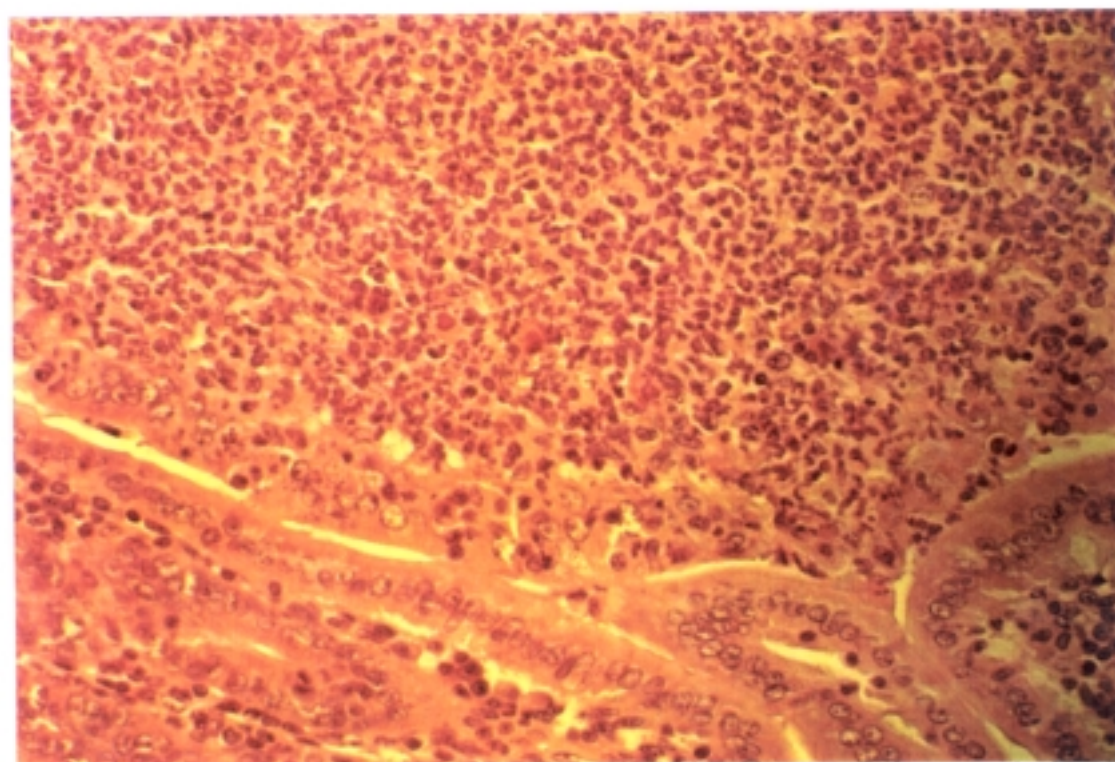


Imagen 8- Inflamación purulenta circunscrita a las áreas cúpula de las Placas de Peyer en un deficiente (1 dpi), a mayores aumentos que 7.

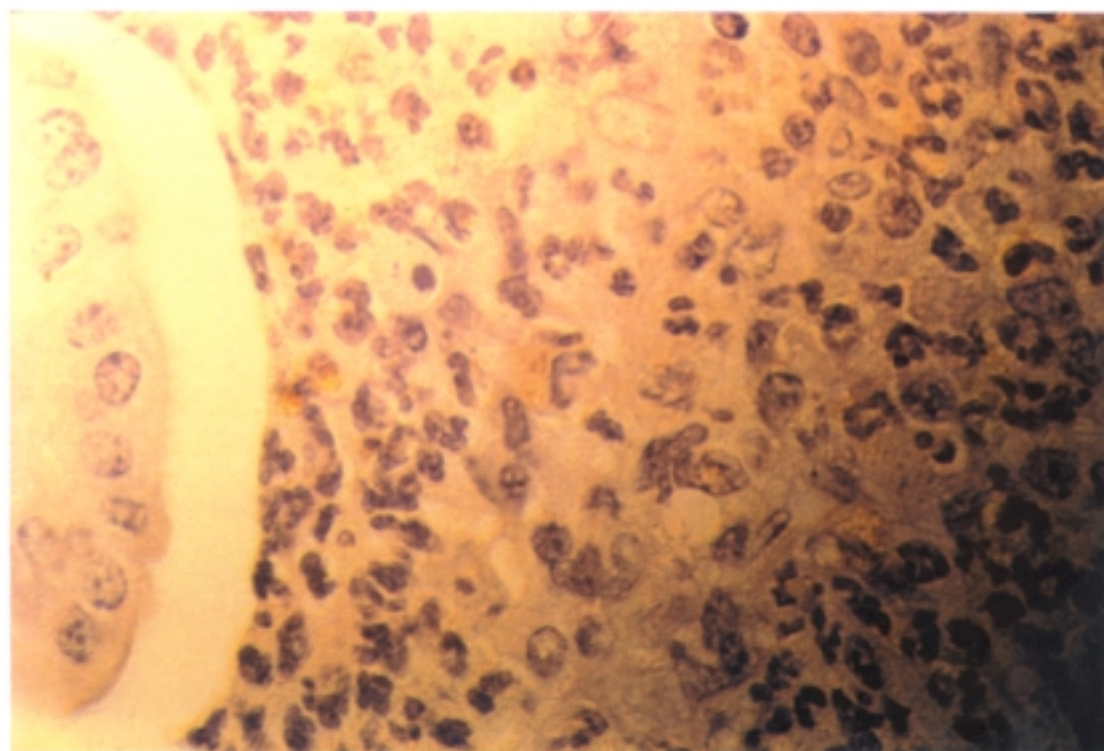


Imagen 9- Reacción positiva a PAP en Placas de Peyer en un deficiente (1 dpi).

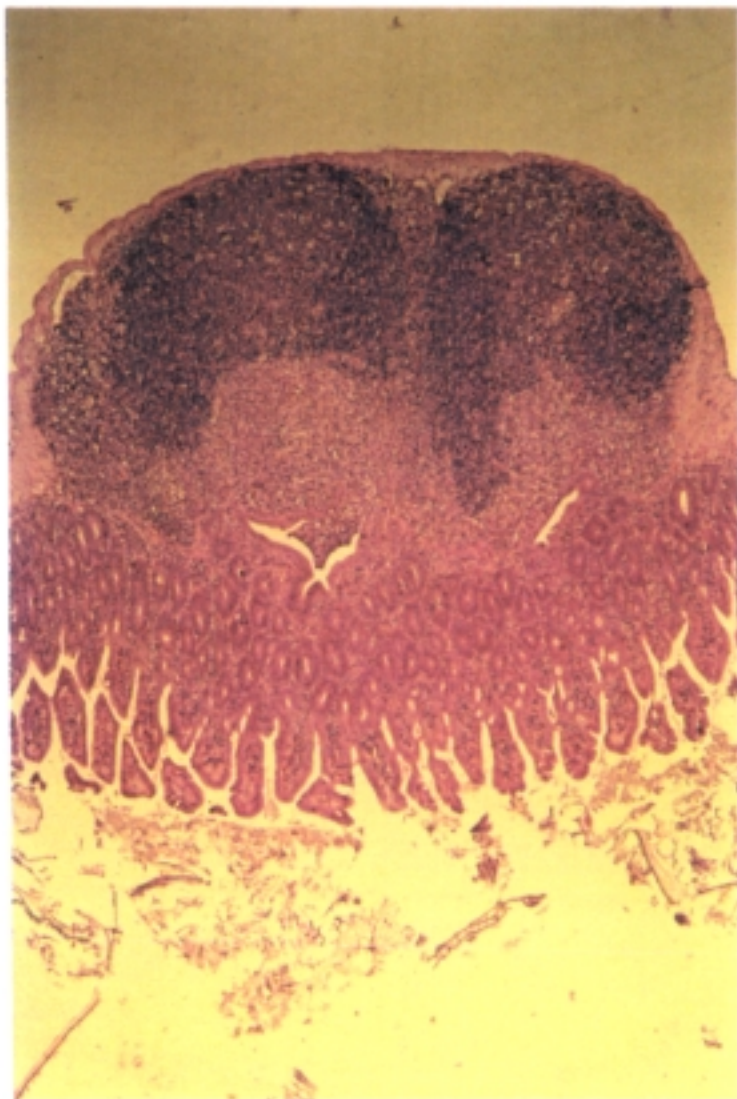


Imagen 10- Inflamación purulenta circunscrita a las áreas cúpula de las Placas de Peyer en un deficiente (3 dpi).

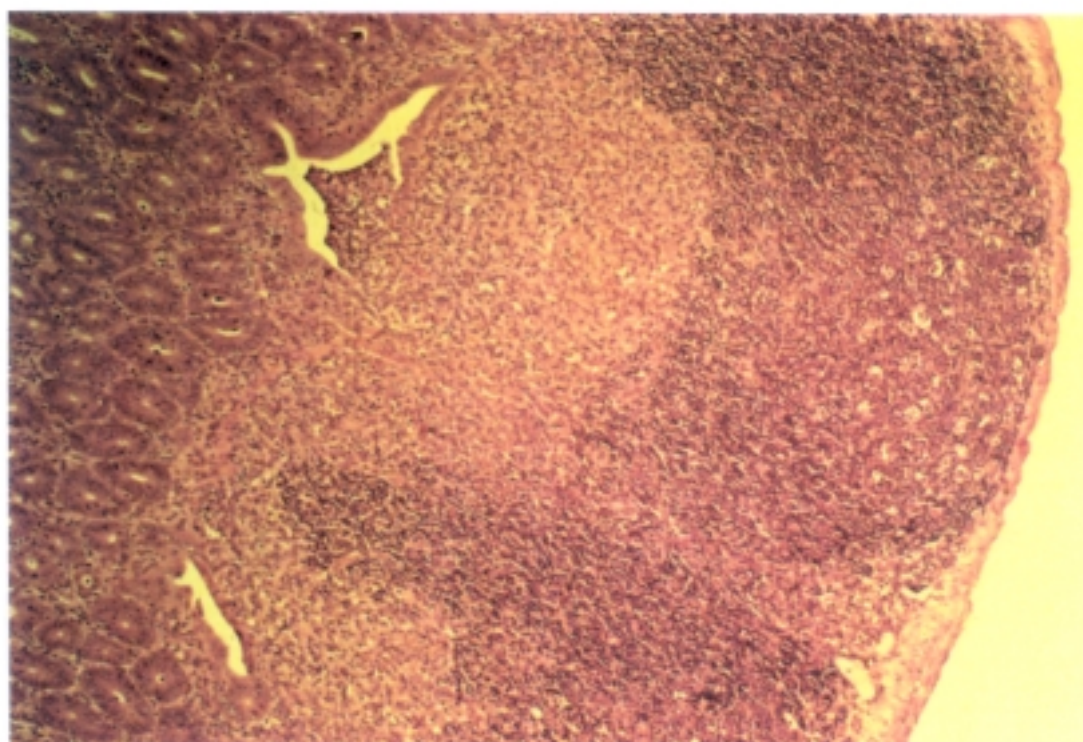


Imagen 11- Igual a la imagen 10, pero a mayores aumentos.

Es de destacar que aunque el número de listerias que consiguen atravesar la barrera intestinal es relativamente escaso (Marco *et al.*, 1992b), pero suficiente para infectar el epitelio intestinal y las placas de Peyer, tal y como afirman distintos autores (Gaillard *et al.*, 1987a; Domingo *et al.*, 1992; Marco *et al.*, 1992b; Czuprynski, 1994), donde realizaría una primera multiplicación que le permitiría adquirir un número suficiente para que la acción de los macrófagos no sea definitiva (Gaillard *et al.*, 1987a, 1987b), pasar a los ganglios linfáticos regionales y, desde ahí, alcanzar el hígado y el bazo (Golnazarian *et al.*, 1989), donde bien sería controlada la infección, o bien, tras un nuevo período de multiplicación, se diseminaría por el hospedador dando lugar a nuevos focos en órganos distintos a los mencionados (Schlech, 1990; Marco *et al.*, 1992b). Esta primera multiplicación en células epiteliales ha sido observada por otros autores utilizando cultivos celulares de la línea Caco-2 (Gaillard *et al.*, 1987b; Berche *et al.*, 1988).

Una vez atravesada la mucosa digestiva las listerias podrían seguir varios caminos: o bien generalizarse por vía sanguínea, bien por vía linfática, o bien por vía linfohematógena. Nuevamente, la rápida aparición de listerias en los ganglios mesentéricos, con respecto al hígado y bazo (graf. 3d), parece confirmar lo expuesto por otros autores (Golnazarian *et al.*, 1989; Marco *et al.*, 1991, 1992a; Low y Donachie, 1991) en el sentido de que la vía utilizada es la segunda. Llama poderosamente la atención la desaparición de las listerias más rápida de los ganglios que de sus tramos respectivos de tubo digestivo (graf. 3c y d, 4a, b, c, d y e).

En el caso de los ratones deficientes, la infección, entendida como la presencia y multiplicación de listerias en el hospedador, se prolonga en el tiempo, apareciendo antes en hígado, y tardando más en desaparecer, a lo que se añade la obtención de recuentos mayores en hígado y bazo. Por otra parte, en este segundo caso, se puede observar un leve aumento de los recuentos hacia el día 7 en el hígado y 8 en el bazo, que podría corresponderse, al igual que sucediera en la vía iv, con una posible reactivación (graf. 3).

Además, debemos reseñar cómo la cinética de la infección (gráf 3 y 4) es similar en ambos grupos, si bien los valores de los deficientes se encuentran, por lo general, por encima de los de los controles, lo que es especialmente visible en las gráficas de hígado y bazo (3a y b). Por otra parte, la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de órganos internos y tubo digestivo cesa antes en el caso de los no deficientes, excepción hecha del estómago.

Es de destacar la rápida aparición de listerias en los ganglios linfáticos muestreados, incluyendo el ganglio submandibular (graf 3), ya que el que aparezcan en el mesentérico a las 6 horas, y posiblemente antes de ese tiempo, no debería extrañarnos al utilizar el intestino como puerta de entrada. Este resultado del ganglio submandibular, podría indicar la existencia de otra puerta de entrada en el tracto superior del aparato digestivo, posiblemente las tonsilas, algo ya sugerido por nuestro grupo de trabajo en otros estudios (Briones, 1990; López *et al.*, 1993), ya que consideramos descartable que esto se deba a la posibilidad de una generalización de la infección por aparecer en este lugar antes que en hígado y bazo, además de que estos ganglios recogen el drenaje de toda la zona orofaríngea. Lamentablemente no se pudo evidenciar histologicamente las tonsilas de los ratones, por lo que nos fue imposible confirmar la utilización de estas formaciones linfoides como puerta de entrada al hospedador.

Sin embargo, se realizó un pequeño experimento adicional con la intención de comparar la dinámica de la infección de *L. monocytogenes* en ganglio submandibular en animales inoculados por vía iv con la observada por vía oral. Siguiendo la misma pauta que la utilizada en los estudios de seguimiento por vía iv (4.III.b), se muestrearon los ganglios submandibulares de ratones inoculados por esta vía con dosis de $10^{5.5}$ Lm/ratón hasta el día 5 pi. Los resultados obtenidos (no mostrados) reflejaban una dinámica y tasa de recuperación a partir de dicho órgano similar a la reflejada en la gráfica 3c, pero con un retraso de 48 horas hasta obtener los primeros aislamientos. A nuestro juicio, este retraso nos permite sustentar, suficientemente, la idea de que en la inoculación por vía oral podría haber una penetración a nivel del tracto digestivo superior, ya que aparecen antes en esta estructura cuando la inoculación es por vía oral que cuando se realiza por vía iv.

Otros autores (Racz, citado por Gaillard *et al.*, 1987a) han señalado la posibilidad de que las listerias penetren a través de otras mucosas como la corneal, bronquial o conjuntival, por lo que no sería extraño la utilización de la mucosa digestiva a diferentes niveles. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, esta, llamemos, puerta superior parece ser de menor importancia cuantitativa que la mucosa intestinal, ya que tanto los valores encontrados como el tiempo que tardan en desaparecer las listerias de este ganglio es menor que en el caso del ganglio mesentérico. Sin embargo, es de gran trascendencia cualitativa, ya que supone soslayar la acción de los ácidos gástricos, lo que podría restar importancia al posible efecto del pH gástrico respecto al establecimiento de la infección. Además, representa una

grave carencia en aquellos estudios que se sirven de la vía intragástrica (ig) como vía de inoculación frente a la vía oral (López *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista histológico las lesiones encontradas en los ganglios linfáticos mesentéricos, en ambos grupos, fueron ligeras lesiones multifocales de tipo piogranulomatoso (PMNS y macrófagos) desde el día 2 hasta el 4 pi. Estas lesiones se encontraron distribuidas de forma constante por las áreas T-dependientes de la corteza del ganglio. La mayoría de estas lesiones se encontraron asociadas a la presencia de listerias. Hay que notar que, de forma general, el grado de inflamación en las placas de Peyer no se correspondió con cambio histopatológico notable en hígado, bazo o ganglios linfáticos mesentéricos.

En líneas generales, nuestros resultados en bazo y ganglios mesentéricos se asemejan bastante a los expuestos por Audurier *et al.* (1981) durante los 3 primeros días. Este autor utilizó la vía oral con tres cepas de *L. monocytogenes* 4b obteniendo un aumento de los recuentos en esos días; sin embargo, nos es imposible hacer comparaciones más allá de ese tiempo al interrumpir sus resultados en ese punto. En nuestro caso, los aumentos en los recuentos son muy similares, aunque con valores algo inferiores a los encontrados por este autor. Estas diferencias podrían ser debidas a la utilización de cepas distintas. Los resultados obtenidos en el bazo concuerdan, también, con los ya citados (Archinal y Wilder, 1988a; Cossart y Mengaud, 1989), y en este caso más exactamente que en la vía iv. Así, por vía oral el incremento del número de listerias en bazo se produce hasta el día 3, e incluso 4 en el caso de los deficientes. Esto parece confirmar una misma dinámica de infección sea cual sea la vía de inoculación empleada, aunque cada vía se diferencia por el tiempo que tarda en controlarse esa infección. En este sentido, por vía oral el número de listerias en hígado y bazo es cero hasta el día 1 pi, mientras que en intravenosa es ya alto en las primeras horas debido a la falta de filtro intestinal.

En cuanto a los resultados obtenidos del hígado, el hecho de que las listerias desaparezcan 4 días antes en los controles que en los deficientes, podría estar relacionado con una más pronta sensibilización de los linfocitos T, tal y como señalan otros autores (Goosens *et al.*, 1988), esta activación debe suponerse alterada en los deficientes, tal y como se estudiará en el apartado 4.X.

Paradójicamente, aunque se obtuvieron recuentos en todos los órganos muestreados, tan sólo se detectaron lesiones histológicas significativas en el hígado de los animales deficientes. Las lesiones observadas consistieron en microabscesos distribuidos de forma aleatoria por el parénquima, en algunas de las cuales se pudieron observar listerias. Las lesiones descritas se observaron los días 2 y 3 pi. El resto de los órganos estudiados no presentó lesión alguna durante la experiencia.

Finalmente debe reseñarse que las diferencias observadas en las gráficas fueron estimadas como significativas tras el estudio estadístico realizado, presentando un valor de $p < 0,05$.

4.IV.b- CON *LISTERIA MONOCYTOGENES* 1/2a

Los resultados de la infección con 1/2a por vía oral pueden observarse en la tabla 14. Los valores obtenidos en tubo digestivo son realmente bajos, no superando los 10^5 Lm/g en el intestino grueso, de donde, además, desaparece en 48 horas; respecto a otros tramos del tubo digestivo, exceptuando esófago, los recuentos son prácticamente testimoniales, e incluso no se lograron recuperar listerias a partir de estómago ni intestino delgado. Nuestros datos no nos permiten explicar la razón de este hecho, pero en cualquier caso demuestran una escasa capacidad de supervivencia de este serovar en tracto digestivo.

Pese a todo ello, existe una cierta diseminación extraintestinal, reflejada en los recuentos obtenidos a partir de ganglios y órganos internos. Según estos resultados, la cepa de 1/2a utilizada presenta un poder infectivo muy bajo, ya que su tiempo de permanencia en los órganos no es superior a los 4-5 días en ningún caso.

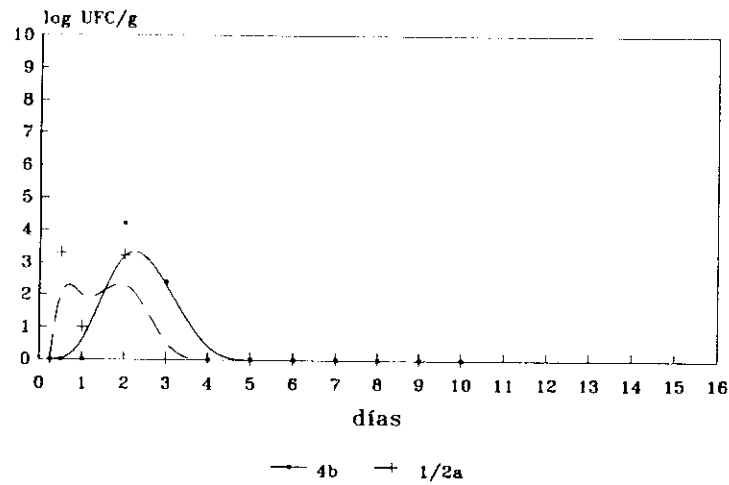
4.IV.c- COMPARACION DE AMBOS SEROTIPOS

Si comparamos los resultados obtenidos con los dos serotipos utilizados en nuestros experimentos (tablas 13 y 14, y gráf. 5 y 6), podemos observar cómo la cepa de 4b es capaz de permanecer más tiempo tanto en órganos internos como en el tubo digestivo, mientras que la presencia de 1/2a en este último es prácticamente testimonial; asimismo, los recuentos en todos los casos son superiores con 4b que con la cepa de 1/2a empleada. Todo lo cual, en el

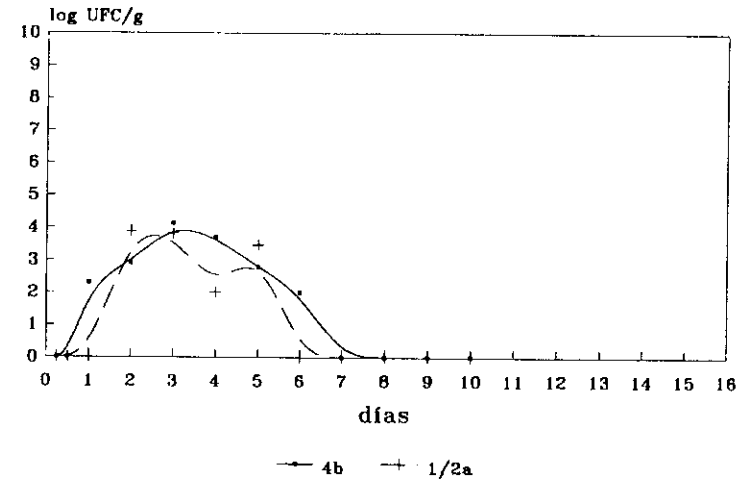
| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------|--------|------|--------------------|
| 6 h | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $2,35 \times 10^5$ |
| 12 h | 2×10^3 | 0 | 0 | 0 | 2×10^2 | 0 | 0 | 0 | $2,35 \times 10^5$ |
| 24 h | 1×10^2 | 0 | 1×10^2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1×10^2 |
| 2 d | $1,67 \times 10^3$ | $7,75 \times 10^3$ | $5,9 \times 10^3$ | $2,2 \times 10^4$ | 0 | $3,47 \times 10^4$ | 0 | 0 | 0 |
| 3 d | 0 | $6,6 \times 10^3$ | 2×10^2 | 1×10^2 | 0 | 10^2 | 0 | 0 | 0 |
| 4 d | 0 | 1×10^2 | 1×10^2 | 1×10^2 | 0 | 3×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| 5 d | 0 | $2,97 \times 10^3$ | 3×10^2 | $7,9 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 14- Resultado de los recuentos en los distintos órganos de ratones no deficientes inoculados por vía oral con Lm 1/2a (10^9 Lm/ml).

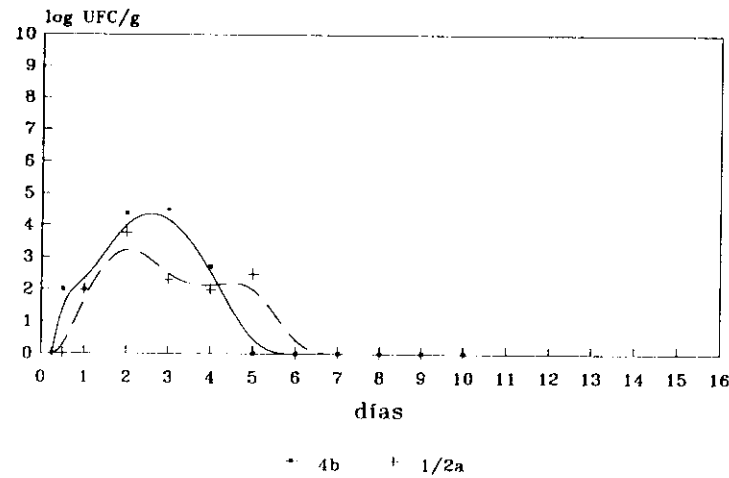
a- Hígado



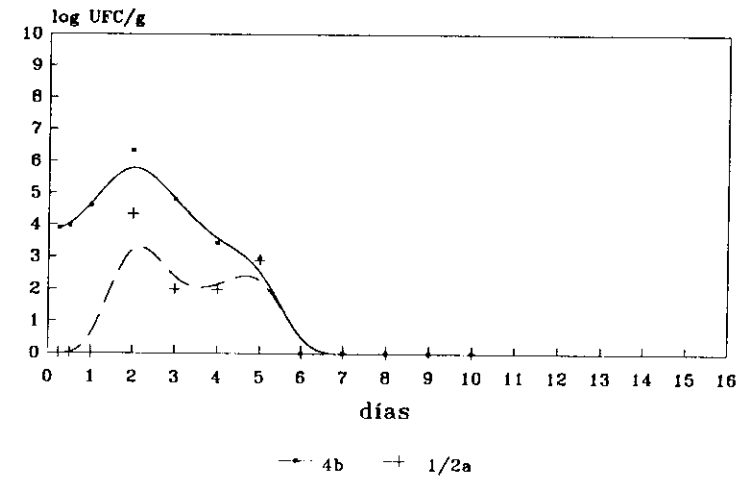
b- Bazo



c- Ganglio submandibular

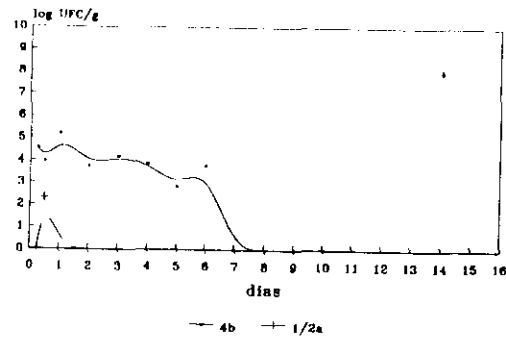


d- Ganglio mesentérico

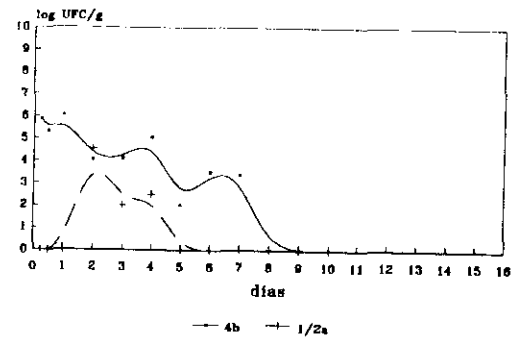


Gráf. 5- Comparación de la dinámica de los recuentos en órganos internos tras inoculación por vía oral con Lm 1/2a y 4b.

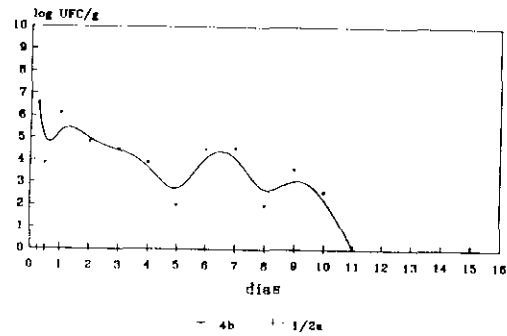
a- Orofaringe



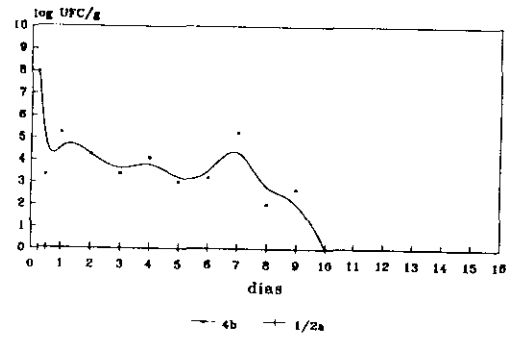
b- Esófago



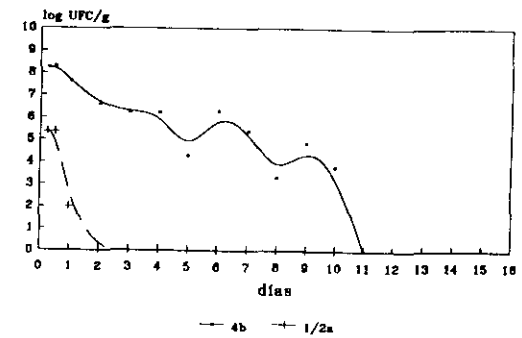
c- Estómago



d- I. delgado



e- I. grueso



Gráf. 6- Comparación de la dinámica de los recuentos en tubo digestivo tras inoculación por vía oral con Lm 1/2a y 4b.

caso de 4b, aumentaría las posibilidades de producir una infección y, en consecuencia, el desarrollo de la enfermedad y eventualmente la muerte del hospedador.

En este sentido no debemos olvidar una gran diferencia entre los serotipos empleados, y expuesta por Kaufmann (citado por Mainou-Fowler *et al.*, 1988), según el cual la cepa de 1/2a NCTC 7973 resulta ser un serotipo con infección no persistente, mientras que 4b sí lo es; las cepas persistentes serían aquellas que tras inoculación intravenosa podrían ser aisladas de bazo a los 6 días pi, mientras que las no persistentes serían rápidamente eliminadas y no podrían detectarse en bazo a los 6 días pi. Aunque este estudio se realizó utilizando la vía endovenosa, nuestros resultados confirman estas observaciones por otra vía.

Para concluir, nuestros resultados parecen confirmar la idea existente sobre una mayor virulencia de el serotipo 4b, basada en datos epidemiológicos, expresada por otros autores (Barbour *et al.*, 1992; Brosch *et al.*, 1992; Tabouret *et al.*, 1991). Esto podría explicar la mayor frecuencia de aparición de este serotipo frente a 1/2a en los brotes de listeriosis tal y como se expuso en el apartado 1.IV.c, donde se señalaron porcentajes de aparición de entre un 62-64% y un 13-15% respectivamente (Goulet *et al.*, 1989; McLauchlin, 1990), e incluso, más ampliamente, de un 92% para los serovares del grupo 4 frente al 8% restante para el grupo 1/2 en nuestro país (Gómez Mampaso, 1993).

4.V- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA INTRAGASTRICA

Esta vía ha sido considerada por algunos autores (Barbour *et al.*, 1992) como la más natural para la infección con *Listeria*, además de haber sido utilizada en numerosas infecciones experimentales por vía "oral" (Schlech, 1990). En nuestro caso únicamente se realizó con el serovar 1/2a, puesto que la gran mayoría de los estudios por esta vía se han realizado con este serovar, y al haber encontrado diferencias en el comportamiento entre los serovares utilizados en la vía oral se pretendía ver la posible existencia de diferencias al utilizar distintas vías de inoculación con esta cepa, que además es la cepa tipo de la especie.

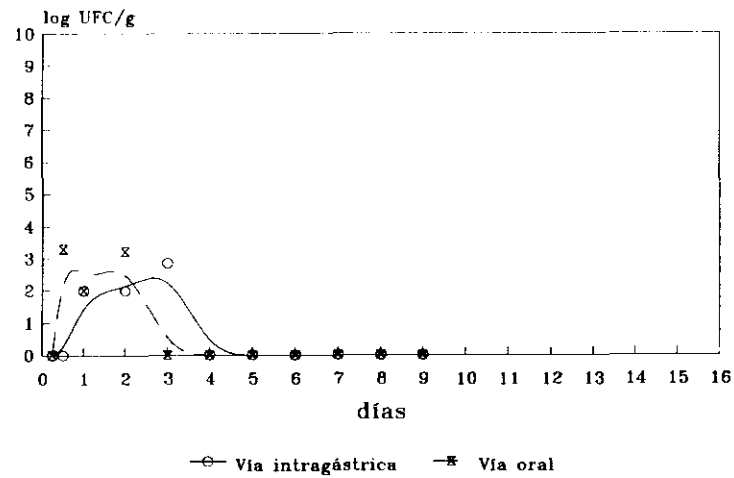
Los resultados obtenidos por esta vía pueden observarse en la tabla 15. Entre éstos llama la atención la presencia de listerias en la región orofaríngea y en esófago desde las 6 horas pi, así como su persistencia en pequeñas cantidades en estas zonas hasta los días 6 y

| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| 6 h | 0 | 0 | 0 | 0 | $1,5 \times 10^2$ | $4,45 \times 10^2$ | 0 | 0 | 1×10^6 |
| 12 h | 0 | 0 | 0 | 0 | 1×10^2 | 1×10^2 | 0 | 0 | $2,14 \times 10^5$ |
| 24 h | 1×10^2 | 1×10^2 | 0 | 0 | 1×10^2 | $1,45 \times 10^4$ | 0 | 1×10^2 | $3,98 \times 10^2$ |
| 2 d | 1×10^2 | 1×10^2 | 0 | 0 | $9,35 \times 10^3$ | 1×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 d | 7×10^2 | $6,76 \times 10^4$ | 0 | 0 | 1×10^2 | $8,2 \times 10^4$ | 1×10^3 | 0 | 0 |
| 4 d | 0 | 1×10^2 | 0 | $2,14 \times 10^4$ | 1×10^2 | 1×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| 5 d | 0 | 2×10^2 | $1,6 \times 10^3$ | 0 | 1×10^2 | $7,5 \times 10^3$ | 0 | 0 | 0 |
| 6 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 7×10^2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

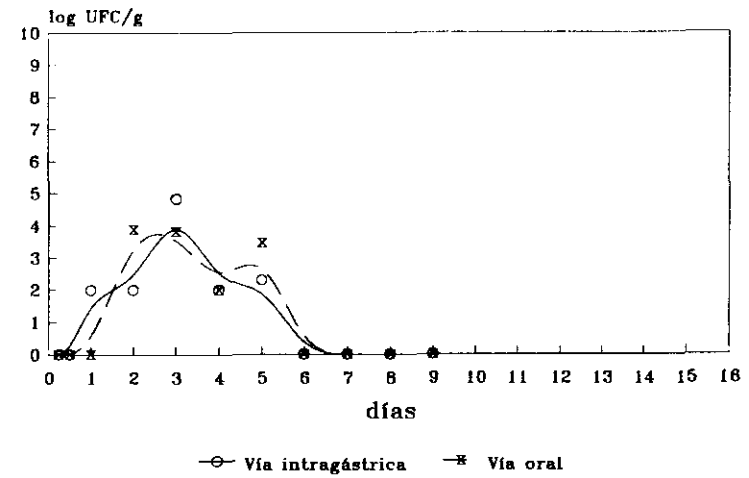
Tabla 15- Resultado de los recuentos en los distintos órganos de ratones no deficientes inoculados por vía intragástrica con 1/2a (10^9 Lm/ml).

Los recuentos de pulmón de todos los animales fue negativo.

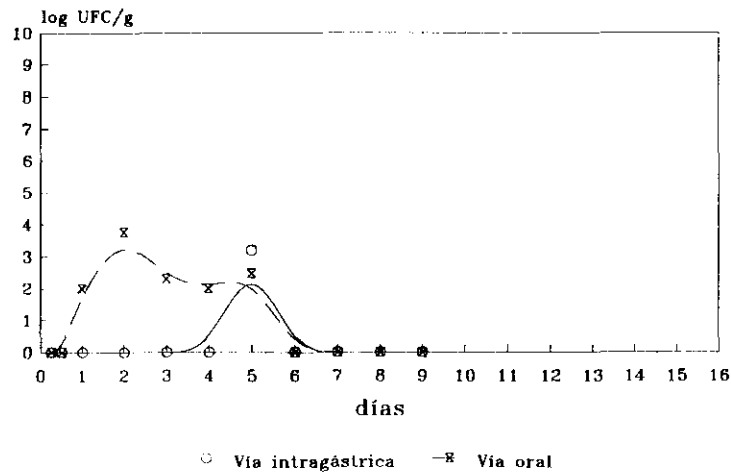
a- Hígado



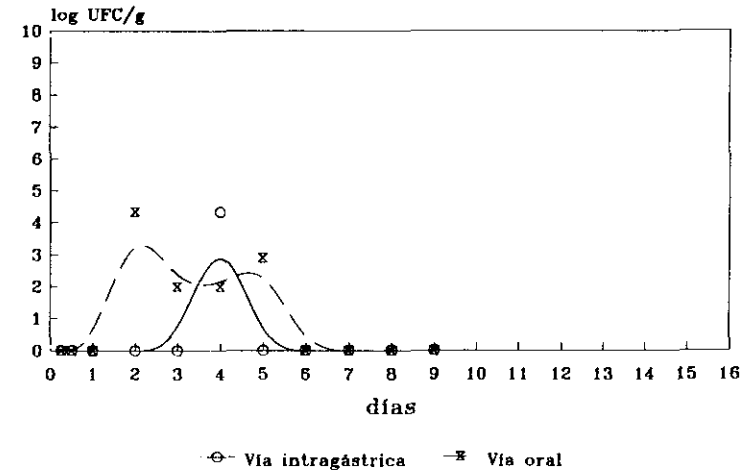
b- Bazo



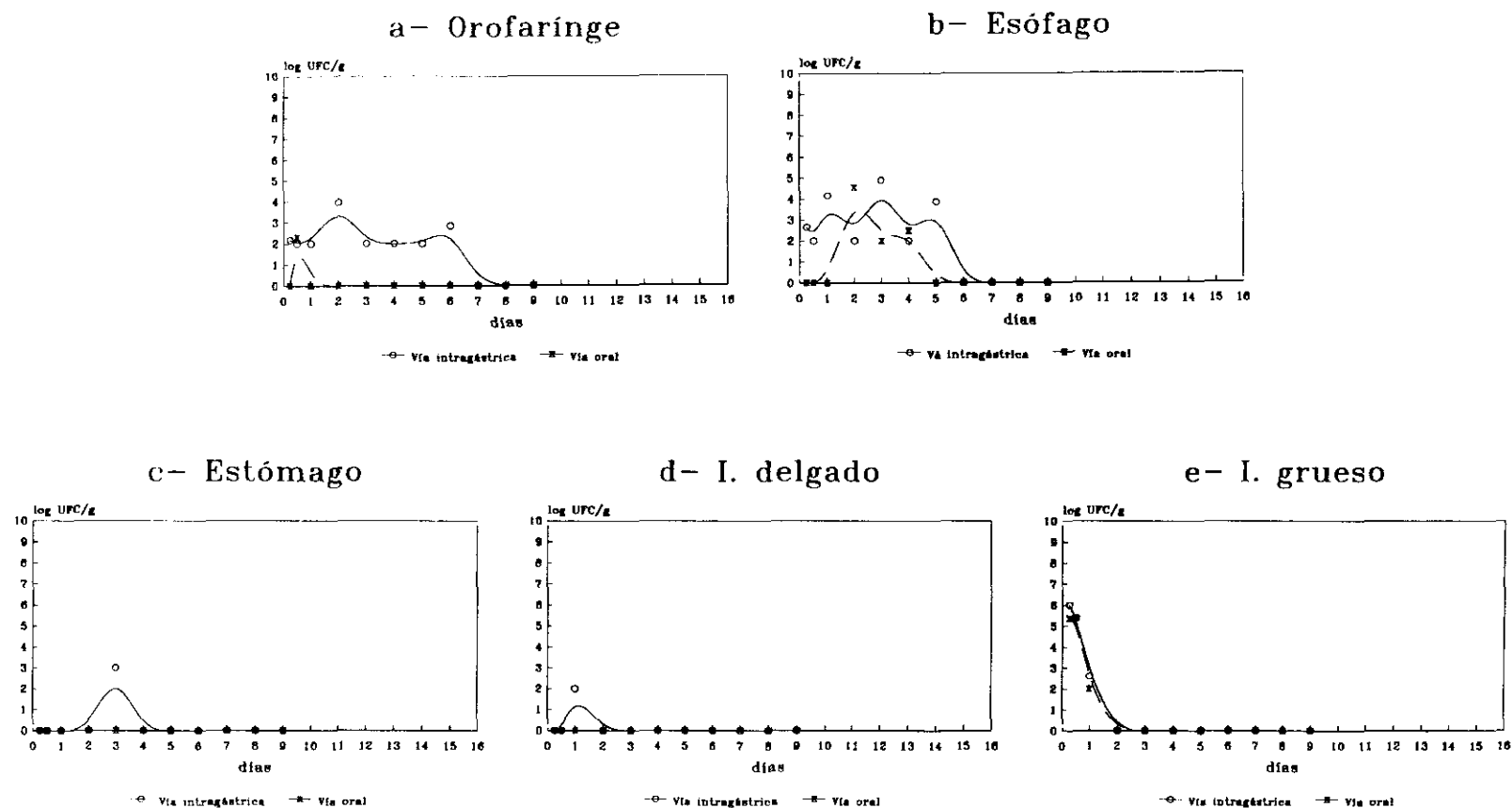
c- Ganglio submandibular



d- Ganglio mesentérico



Gráf. 7- Comparación de la dinámica de los recuentos en órganos internos tras inoculación oral e intragástrica con Lm 1/2a.



Gráf. 8- Comparación de la dinámica de los recuentos en tubo digestivo tras inoculación oral e intragástrica con Lm 1/2a.

5 respectivamente. Esta presencia podría ser debida a la propia técnica de inoculación, que supone en muchos casos, una casi inapreciable, pero existente erosión de la mucosa esofágica, y a que la retirada de la sonda implica el depósito de una cierta cantidad de inóculo en el tracto digestivo superior, cuyo epitelio, levemente alterado, permite a *Listeria* una mejor colonización, hecho demostrado histológicamente por Domingo (comunicación personal). No se obtuvieron recuentos de pulmones a partir de ninguno de los animales muestreados, datos no reflejados en la tabla 15 ni en las gráficas correspondientes, por lo que podemos considerar que la inoculación se realizó correctamente.

Por otra parte, también llama la atención el aislamiento de listerias a partir de estómago e intestino delgado, los días 3 y 1 respectivamente. A este respecto debemos decir que estos aislamientos fueron realizados únicamente en uno de los ratones sacrificados ese día, y podría deberse a la existencia de factores individuales, o a una mala práctica de la inoculación, sin que podamos explicar este hecho.

Sin embargo, los recuentos de intestino grueso son similares a los que se obtienen con esta misma cepa por vía oral, lo que confirma el bajo poder de colonización intestinal señalado por otros autores (Marco *et al.*, 1992b).

Según nuestros resultados, se obtienen recuentos mayores en bazo que en hígado, siendo además la persistencia mayor en el primero que en el segundo (graf. 7). Además, los recuentos mayores se observan entre los días 3 y 4 en ambos órganos, lo que concuerda con otros autores (Barbour *et al.*, 1992; Bracegirdle *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1992). Sin embargo, algunos de estos autores (Barbour *et al.*, 1992; Bracegirdle *et al.*, 1992) afirman que no se aíslan cantidades importantes de *Listeria* a partir de hígado y bazo hasta los 3-4 días de una inoculación intragástrica, aunque según nuestros resultados podemos encontrar listerias en hígado y bazo a las 24-48 horas post-inoculación, lo que parece confirmar resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo (Domingo *et al.*, 1992).

4.VI- COMPARACION DE LAS VIAS ORAL-INTRAGASTRICA

Los resultados obtenidos por ambas vías son muy similares en hígado, bazo e intestino grueso, tal como se puede apreciar en las gráficas 7a, 7b y 8e; sin embargo, los resultados

obtenidos en ganglios, estómago e intestino delgado difieren en gran medida (gráficas 7c, 7d, 8c y 8d). Por otra parte, los resultados obtenidos en orofaringe y esófago (gráficas 8a y 8b) pueden deberse a la posible erosión ocasionada por la sonda y al depósito de inóculo producido al retirarla, tal como se explica en el apartado anterior. En definitiva la vía ig ofrece resultados menos consistentes que los obtenidos por vía oral y, en consecuencia, la vía ig no parece ser una elección acertada como vía de inoculación ya que:

- 1- la utilización de sonda lesiona el epitelio esofágico;
- 2- se produce un depósito de inóculo en la zona erosionada al retirar la sonda; lo que, unido a lo anterior, implica una colonización del epitelio de la orofaringe y esófago;
- 3- presenta una mayor complejidad que la vía oral;
- 4- requiere realizar controles de pulmón para asegurar la correcta inoculación;
- 5- no es equivalente al modo natural de infección.

Nuestros resultados confirman lo ya expuesto por nuestro grupo de trabajo (López *et al.*, 1993), al no encontrar mejora alguna al utilizar la vía ig con respecto a la vía oral, ni siquiera para obtener una mejor respuesta humoral. Por tanto, contrariamente a lo expuesto por diversos autores (Barbour *et al.*, 1992) que consideran a la vía intragástrica como la más natural en todos los sentidos, porque altera el contacto de *Listeria* con las zonas linfoides del tracto digestivo superior, que intervienen, según nuestros datos, en el proceso de penetración de estos microorganismos en el hospedador. Además, de no presentar mejora alguna con respecto a la vía oral, es de mayor complejidad al tenerse que administrar el inóculo con una sonda individualmente a cada animal, y deposita de hecho listerias en orofaringe, además de lesionar el epitelio esofágico, falseando los resultados. Otro factor que desaconseja su utilización es la necesidad de realizar recuentos de los pulmones de los animales inoculados para asegurarnos la correcta inoculación (Marco *et al.*, 1992b).

4.VII- SEGUIMIENTO DE LA INFECCION POR VIA ORAL CON 10⁹ 7DIAS

Las tablas 16a y 16b nos muestran los resultados obtenidos con la dosis de 10⁹ Lm/ml administradas durante 7 días. En estas tablas puede observarse cómo los valores de los deficientes son ligeramente superiores a los obtenidos en el caso de los controles, si bien parece que el comportamiento en ambos casos fuera muy similar (gráficas 9 y 10). En este

| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 24 h | 1×10^3 | $2,7 \times 10^3$ | $2,7 \times 10^3$ | $8,55 \times 10^4$ | $3,48 \times 10^4$ | $1,18 \times 10^5$ | $5,8 \times 10^4$ | $3,53 \times 10^6$ | $2,7 \times 10^6$ |
| 3 d | $3,96 \times 10^4$ | $4,97 \times 10^3$ | $1,3 \times 10^3$ | 4×10^3 | $1,35 \times 10^3$ | $6,66 \times 10^2$ | 8×10^4 | $2,2 \times 10^4$ | $4,62 \times 10^4$ |
| 6 d | $1,5 \times 10^2$ | 1×10^2 | 0 | 0 | 1×10^2 | 2×10^2 | 0 | 0 | $3,47 \times 10^4$ |
| 11 d | 4×10^2 | $1,05 \times 10^3$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

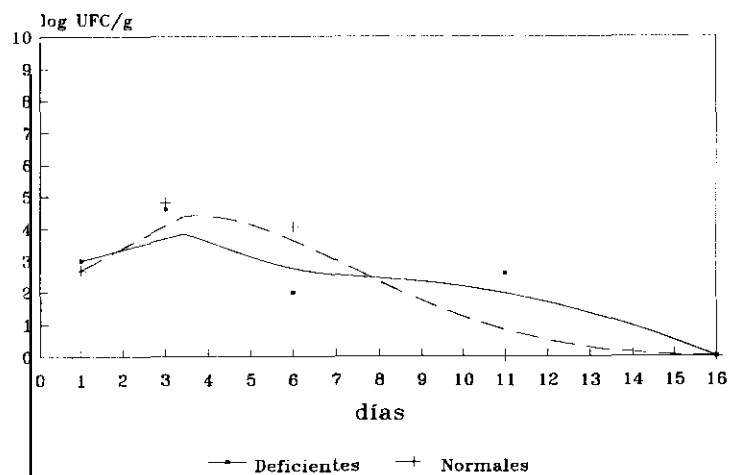
a- Deficientes.

| tpi | hígado | bazo | g. sbm. | g. mes. | orofar. | esóf. | estóm. | i.d. | i.g. |
|------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 24 h | 5×10^2 | 1×10^2 | 2×10^2 | 3×10^2 | 6×10^2 | $1,11 \times 10^4$ | $6,5 \times 10^2$ | $3,12 \times 10^2$ | $8,55 \times 10^5$ |
| 3 d | $6,5 \times 10^4$ | $4,49 \times 10^4$ | 0 | 0 | $2,5 \times 10^2$ | 6×10^2 | $1,9 \times 10^3$ | 4×10^2 | $6,66 \times 10^4$ |
| 6 d | $1,12 \times 10^4$ | $7,06 \times 10^4$ | 0 | 0 | 0 | 2×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| 11 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 d | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

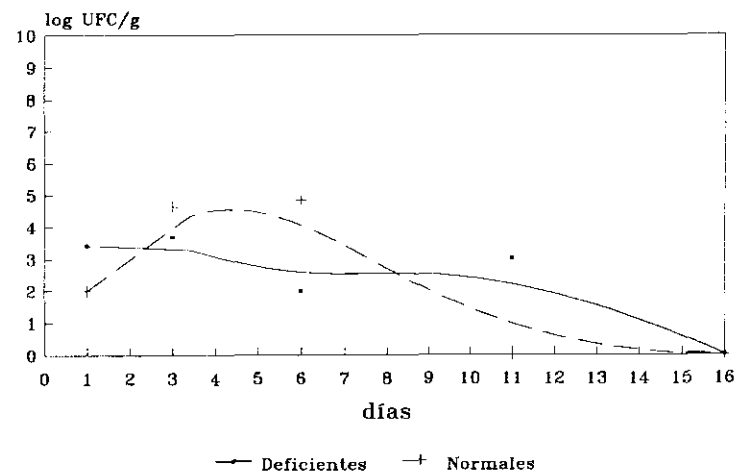
b- Controles.

Tabla 16- Resultado de los recuentos en distintos órganos tras inoculación oral con dosis repetidas (10^9 7 días) en ratones deficientes (a) y no deficientes (b).

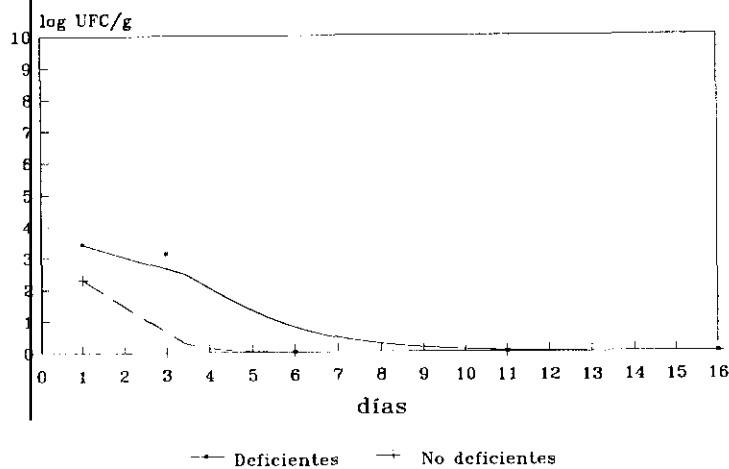
a- Hígado



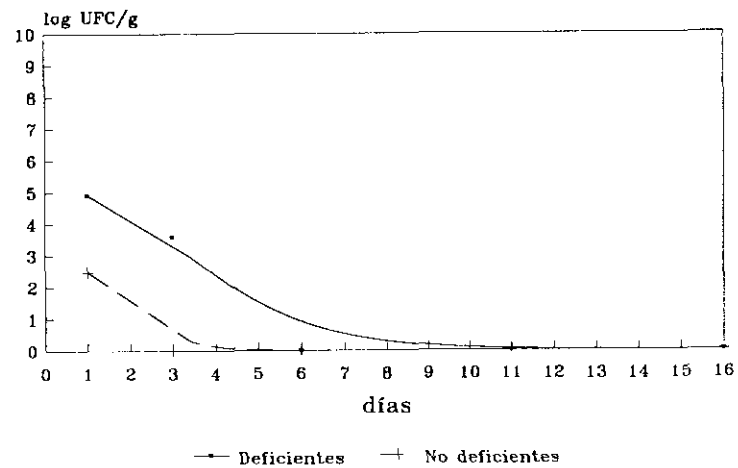
b- Bazo



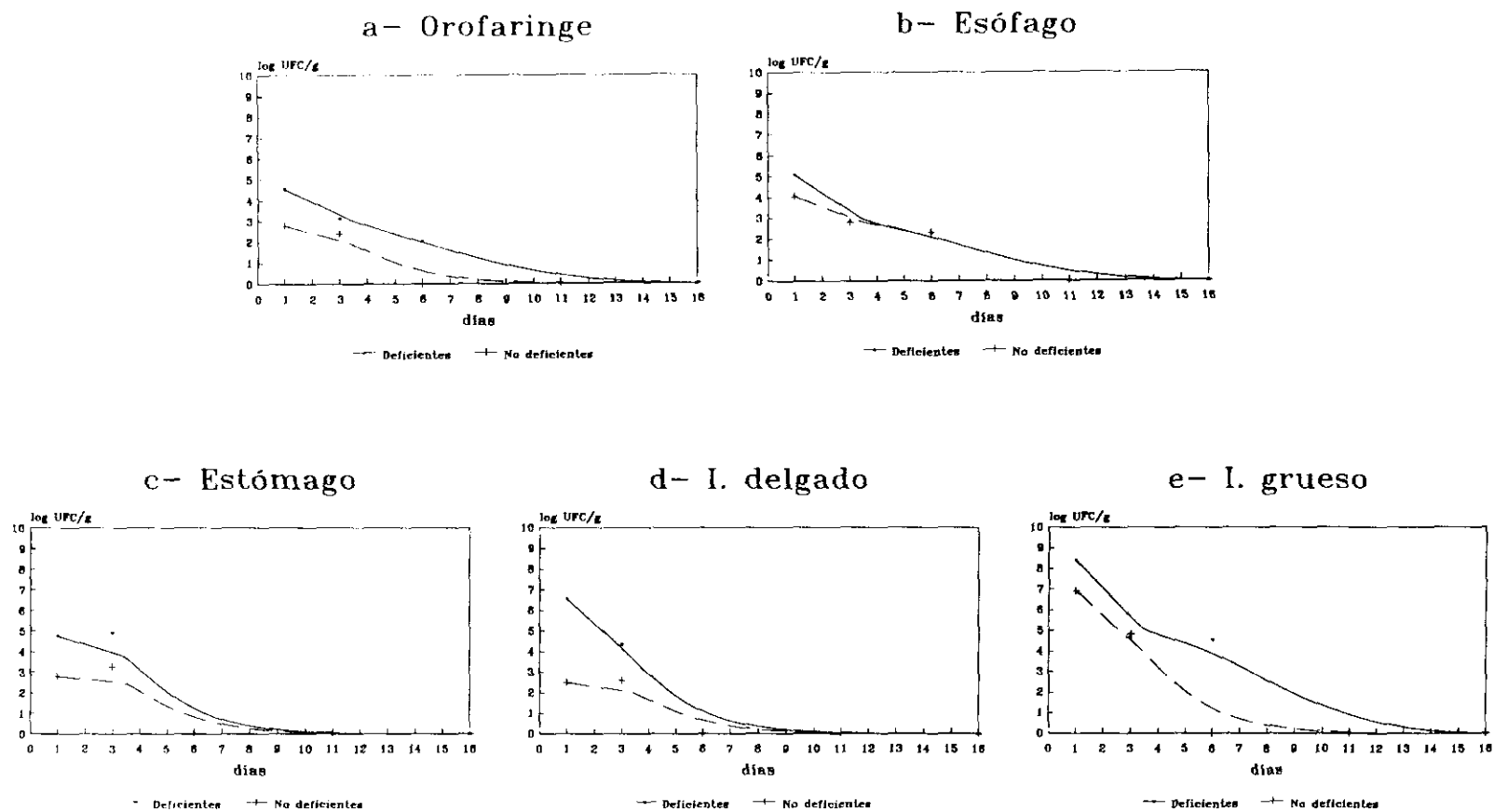
c- Ganglio submandibular



d- Ganglio mesentérico



Gráf. 9- Comparación de la dinámica de los recuentos en ganglios linfáticos tras inoculación oral con 10^9 de Lm 4b de forma repetida (7 días).



Gráf. 10- Comparación de la dinámica de los recuentos en tubo digestivo tras inoculación oral con 10^9 de Lm 4b de forma repetida (7 días).

sentido, parece que en los deficientes la penetración de listerias se alarga algo más que en los controles, como indican los recuentos obtenidos de los ganglios, en los que no desaparecen las listerias hasta después del día 3; mientras que en los controles la penetración acaba antes de ese día.

Otro hecho que parece avalar la tesis de un mayor tiempo de permanencia en el caso de los deficientes, es que los recuentos no desaparecen del intestino grueso hasta después del día 6 en éstos, y antes de ese día en el caso de los controles.

Si comparamos los resultados obtenidos con una única inoculación (gráficas 3 y 4) con los obtenidos con la inoculación repetida durante 7 días (gráficas 9 y 10), podemos observar que los animales inoculados parecen controlar la infección entre los días 5 y 7 pi en ambos casos. Estos resultados no se corresponden con los criterios expuestos por diversos autores (Galsworthy, 1987; Marco *et al.*, 1991), quienes proponen una posible alteración de la capacidad de la respuesta inmune del hospedador derivada de la existencia de lesiones en los órganos linfoides y de un efecto inmunosupresor de la propia *L. monocytogenes*. Nuestros datos demuestran que, en ambos casos, la infección es controlada en el mismo periodo de tiempo, lo que revela que el estatus inmunitario de los animales no se encuentra alterado. Sin embargo, es necesario resaltar que la ingestión repetida de listerias durante 7 días aumentaría las posibilidades de que se produjera infección, lo que podría concordar con la mayor mortalidad observada con esta pauta de inoculación, aunque a diferencia de lo que ocurría en la vía iv no podemos establecer una relación directa entre este hecho y la cinética de la infección observada.

4.VIII- DEFICIENCIA EN SELENIO Y VITAMINA E Y SUSCEPTIBILIDAD A LA LISTERIOSIS

La existencia de mortalidades mayores en el caso de los animales deficientes, así como que, en general, los recuentos obtenidos de órganos internos sean mayores en éstos y que las lesiones histológicas sean también más intensas en los deficientes, nos inclina a pensar en una mayor susceptibilidad a la listeriosis en el caso de estos animales. Dicha susceptibilidad se debería a los siguientes factores:

- 1- alteración de la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos;
- 2- menor expresión de receptores de IL2 en los linfocitos;
- 3- menor presentación de antígeno por parte de las células correspondientes.

Estos resultados se encuentran en clara contradicción con los expuestos por Murray y Murray (1985), según los cuales la deficiencia en selenio conferiría una mayor resistencia a la listeriosis, disminuyendo la mortalidad en ratones. Sin embargo, estos autores suplementaron la dieta con vitamina E; que, como ya hemos apuntado, puede actuar como sustituto del selenio, suavizando los efectos de su deficiencia. Además, no se comenta ni la cantidad de selenio en la dieta deficiente, ni el tiempo que tardaron los ratones en convertirse en deficientes. Por tanto, podría haber ocurrido que los ratones no fueran deficientes en el momento de la experiencia, y la mayor resistencia fuera debida a otro fenómeno distinto a la deficiencia en selenio.

Los mecanismos de resistencia a la listeriosis son muy complicados, tal y cómo apuntamos en el apartado 1.V.b de la introducción. Debemos recordar que la resistencia natural a la listeriosis radica en la capacidad de establecer una respuesta inflamatoria asociada a células T sensibilizadas (Archinal y Wilder, 1988a), cuyo fallo en cualquiera de sus estadios previos sería el responsable de un aumento de la susceptibilidad a padecer esta enfermedad.

Al inicio de la infección, las primeras células fagocíticas en llegar al hígado son los neutrófilos, en esta temprana llegada de los neutrófilos parece estar involucrada el TNF-alfa (Mielke *et al.*, 1993). Estos tienen la misión de evitar la propagación de la infección, para lo cual destruirían los hepatocitos infectados, dejando libres las listerias que se encontraban en su interior, y que así quedan expuestas a la acción de los macrófagos y monocitos (Conlan y North, 1993, 1994). Por tanto la acción de estas células es de vital importancia para el hospedador, ya que limitan el crecimiento inicial en los hepatocitos, además de dejar las listerias expuestas a la acción de los macrófagos y monocitos. Durante una deficiencia en selenio y vitamina E, las funciones fagocíticas de los neutrófilos se encuentran tan alteradas como las de los macrófagos (Gyang *et al.*, 1984; Erskine *et al.*, 1989), por lo que es muy posible que la acción limitante realizada por ellos se encuentre disminuida. Esto último

facilitaría la formación de focos infecciosos principalmente en hígado y bazo, en los cuales las listerias se multiplicarían antes de la llegada de los monocitos/macrófagos a partir de las 24-48 horas post-infección, lo que parece estar en total acuerdo con los resultados expuestos en la tabla 11.

Una vez englobadas las listerias en el fagosoma se produce una acidificación del mismo (Chastellier y Berche, 1994). Esta acidificación resulta indispensable para que pueda actuar la Listeriolisina O (LLO), cuyo pH óptimo de actuación es 5,5 (Berche *et al.*, 1988; Cossart y Mengaud, 1989). Además, el fagosoma es un medio carente de hierro, lo que estimula aún más la secreción de esta citolisina (Berche *et al.*, 1988). Mediante la acción de ésta la bacteria consigue liberarse del fagosoma antes de que resulte dañada, y multiplicarse en el citoplasma, donde el ambiente resulta menos dañino para estas bacterias, y donde por añadidura existe disponibilidad de hierro (Berche *et al.*, 1988; Cossart y Mengaud, 1989). Esta multiplicación resulta esencial para la inducción de una inmunidad mediada por linfocitos T (Berche *et al.*, 1987; Brunt *et al.*, 1990; Chastellier y Berche, 1994), y explica por qué esta inmunidad no se obtiene con bacterias muertas.

El número de bacterias que consigue escapar del fagosoma antes de la fusión de éste con el lisosoma resulta muy pequeño (Chastellier y Berche, 1994), pero suficiente para producir las alteraciones posteriores. Estas bacterias, una vez multiplicadas en el citoplasma, son capaces de moverse mediante un mecanismo actina-dependiente e infectar células adyacentes (Tielney y Tielney, 1993; Chastellier y Berche, 1994) sin necesidad de salir al medio extracelular, lo que las expondría al sistema inmune del hospedador.

Conjuntamente con la acidificación del fagosoma se produce la explosión oxidativa en el fagosoma, mediante la que se aumentan considerablemente los compuestos de oxígeno (peróxidos principalmente) que sirven como mecanismo bactericida general, aunque no parecen tener dicho efecto en la listeriosis (Harrington-Fowler *et al.*, 1981; Higginbotham *et al.*, 1992).

Por tanto, al liberarse del fagosoma es muy posible que estas bacterias desencadenen la muerte del macrófago por un mecanismo similar a la apoptosis (Greenspan y Aruoma, 1994; Zychlinski *et al.*, 1994), que le imposibilitaría para realizar su misión como presentador

de antígenos. Pero la presentación de antígenos también parece verse afectada por la LLO (Cluff *et al.*, 1990); según este autor, la LLO puede inhibir esta función, evitando la estimulación de los linfocitos T, y, por tanto, la activación macrofágica. En el caso de la deficiencia en selenio y vitamina E ya hemos expuesto que las membranas de las células se encuentran afectadas por defecto de GSHPx, y que ello implica una mayor facilidad de *Listeria* para salir del fagosoma. Esta salida está acompañada por liberación de LLO, lo que finalmente implicaría una mayor cantidad de LLO en la célula, que podría inhibir la función presentadora de antígenos.

Por otra parte, se ha descrito que en los animales deficientes en selenio la expresión de receptores para la IL2 en los linfocitos T se encuentra disminuida (Kiremedjian-Schumacher *et al.*, 1990, 1992; Roy *et al.*, 1992, 1993). Esta disminución en la expresión de estos receptores conllevaría una menor activación de linfocitos T, y esta menor activación linfocitaria implicaría una menor producción de linfoquinas y, por ello, una menor activación de macrófagos. No debemos olvidar que son los macrófagos activados los responsables de la eliminación de las listerias (Harrington-Fowler *et al.*, 1981), y un retraso en su activación permitiría una mayor multiplicación de las listerias, lo que tendría como consecuencia el que el individuo tuviera que enfrentarse a un número mayor de éstas al que inicialmente tendría que haber hecho frente, y que, por tanto, el proceso adquiriese una mayor gravedad.

Además, en el caso de una deficiencia en selenio se produce una disminución de GSHPx, y, por tanto, se disminuye la detoxicación del H_2O_2 cuyas cantidades aumentan. Esta menor concentración de GSHPx conlleva una menor cantidad de glutatión oxidado, que para su reducción necesitaba el paso de NADPH a NADP, lo que implica una reducción del NADP disponible. En líneas generales una deficiencia en selenio nos conduciría al mismo punto de partida que los mecanismos descritos para la apoptosis (Greenspan y Aruoma, 1994; Zychlinski *et al.*, 1994) ya que el exceso de productos de oxígeno conlleva la alteración de la membrana mediante su peroxidación y acción de fosfolipasas, y, como resultado de ello, a la alteración del equilibrio del Ca^{2+} , rotura de las membranas, alteración del ADN celular, y, finalmente, la muerte celular. La alteración del equilibrio del Ca^{2+} puede verse agravada en los casos de deficiencia en α -tocoferol (Eskew *et al.*, 1989), por lo que en nuestro caso la propia deficiencia colaboraría con los fenómenos conducentes a la muerte celular.

Vemos, pues, cómo la deficiencia en selenio produce una alteración en la respuesta inmune de base celular por un fallo en la presentación de antígenos por parte de los macrófagos, y por un fallo en la activación de los mismos al estar disminuida la expresión de los receptores para la IL2. Hemos señalado anteriormente que los factores que influyen en la resistencia a la listeriosis se basan en la capacidad de establecer una respuesta inflamatoria efectiva, la capacidad de los macrófagos para evitar el crecimiento bacteriano en los momentos iniciales de la infección y el tiempo que se tarde en instaurar una respuesta inmune adquirida mediada por células (Archinal y Wilder, 1988a, 1988b); todos estos mecanismos se encuentran alterados en los individuos selenio deficientes, y, por este motivo, resultarían más susceptibles a la listeriosis, puesto que estos patógenos encontrarían mayores facilidades para su viabilidad en estos hospedadores.

5. CONCLUSIONES

PRIMERA

En el modelo experimental murino, los animales deficientes en selenio y vitamina E presentan mayor susceptibilidad a la listeriosis, valorable en índices superiores de mortalidad y en mayores recuentos de bacterias a partir de órganos internos que los grupos controles.

SEGUNDA

La deficiencia en selenio y vitamina E, incluso inaparente (no valorable clínica ni histopatológicamente), podría ser considerada como un factor predisponente respecto a la listeriosis.

TERCERA

La presencia de *Listeria monocytogenes*, cuando es inoculada por vía oral, simultaneamente en los ganglios submandibulares y mesentéricos, y con anterioridad a su recuperación a partir de bazo e hígado, sugiere la existencia de varias puertas de entrada de este microorganismo en el tracto digestivo.

CUARTA

La mortalidad registrada con la misma dosis total inoculada por vía oral es mayor si ésta se fracciona en varias tomas que si se administra en una única toma. Puesto que el desarrollo de los casos de listeriosis está asociado al consumo de alimentos contaminados este efecto acumulativo podría tener relevancia desde un punto de vista epidemiológico y experimental.

QUINTA

Los recuentos de bacterias obtenidos a partir de bazo e hígado muestran un segundo incremento entre el 5º y 8º día post-inoculación, lo que sugiere la existencia de una reactivación tardía de la infección, cuyo tiempo de aparición y magnitud sería dependiente de la dosis y de la vía de inoculación empleada.

SEXTA

El seguimiento de la infección tras inoculación intragástrica ofrece resultados menos consistentes que los obtenidos mediante inoculación por vía oral, por lo que ésta última parece más adecuada para reproducir experimentalmente la enfermedad, ya que reproduce mejor las condiciones naturales de la infección.

SEPTIMA

Cuando se inoculan los serovares 4b y 1/2a a las mismas concentraciones por vía oral, con el serovar 4b se obtienen recuentos más altos y prolongados en intestino, bazo e hígado. Este hecho podría justificar la mayor frecuencia de casos de listeriosis de origen alimentario debidos al serovar 4b.

6. RESUMEN

6. RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado en el modelo experimental murino la influencia de la deficiencia en selenio y vitamina E en la susceptibilidad a la listeriosis. Para ello se han realizado estudios de mortalidad, estableciéndose las tasas de mortalidad por vía oral con dosis únicas y repetidas, así como las DL_{50} por vía intravenosa. Asimismo, se ha estudiado la cinética de la infección por vía oral e intravenosa, mediante recuentos de *L. monocytogenes* a partir de órganos internos y tracto digestivo; se ha comparado además, la cinética de la infección utilizando las vías de inoculación oral e intragástrica, el efecto de dosis repetidas frente a dosis únicas por vía oral, y la infección por vía oral entre los serovares 4b y 1/2a.

De los distintos experimentos, se han obtenido resultados que indican una mayor susceptibilidad a la listeriosis en el caso de la citada deficiencia; que se recupera *L. monocytogenes* a partir de ganglios mesentéricos y submandibulares en las primeras fases de la infección, lo que sugiere distintos puntos de entrada a partir del tracto digestivo, probablemente estructuras linfoides (placas de Peyer, tonsilas, etc.); y que en la listeriosis experimental parece existir una reactivación tardía, cuyo tiempo de aparición sería dependiente de la dosis y la vía de inoculación. Asimismo, se ha podido comprobar que la vía oral presenta evidentes mejoras respecto a la intragástrica a la hora de realizar estudios sobre la listeriosis; así como que la administración de una misma dosis fraccionada en varias tomas produce una mayor mortalidad que si se administra en una única toma. Finalmente, la inoculación por vía oral de los serovares 4b y 1/2a demostró que con el serovar 4b se obtienen recuentos más altos y prolongados en intestino, bazo e hígado que en el caso del serovar 1/2a.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALLERBERGER, F. y GUGGENBICHLER, J. P. (1989). Listeriosis in Austria: report of an outbreak in 1986. *Acta Microbiol. Hung.* 36, 149-152.
- ARCHINAL, W. A. y WILDER, M. S. (1988a). Susceptibility of HRS/J mice to listeriosis: macrophage activity. *Infect. Immun.* 56, 613-618.
- ARCHINAL, W. A. y WILDER, M. S. (1988b). Susceptibility of HRS/J mice to listeriosis: Dynamics of infection. *Infect. Immun.* 56, 607-612.
- ARMSTRONG, D. (1985). L. monocytogenes. En "Principles and practices of infectious diseases" (eds. Mandel, G. L., Douglas, R. G. y Bennet, J. E.), pp. 1177-1186. Ed. Wiley & Sons, Nueva York.
- AUDURIER, A., PARDON, P., MARLY, J., LANTIER, F. y LOULEGUE, J. (1981). Mesure de la virulence chez la souris de différentes bactéries appartenant au genre Listeria. *Ann. Inst. Past. Immunol.* 132D, 191-200.
- AUDURIER, A., TAYLOR, A. G., CARBONNELLE, B. y MCLAUCHLIN, J. (1985). A phage typing system for Listeria monocytogenes and its use in epidemiological studies. *Clin. Invest. Med.* 7, 229-232.
- BACKALL, K. A. y SCHOLZ, R. W. (1979). Reference values for a field test to estimate inadequate glutathione peroxidase activity and selenium status in the blood of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 40, 733-738.
- BARBOUR, A., RAMPLING, A. y HORMAECHE, C. (1992). The infectivity of Listeria monocytogenes following intragastric inoculation into mice. *Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen)* 235-236.
- BARLOW, R. M. y MCGORUM, B. (1985). Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *Vet. Rec.* 116, 233-236.
- BEDWAL, R. S., NAIR, N., SHARMA, M. P. y MATHUR, R. S. (1993). Selenium-its biological perspectives. *Med. Hyp.* 41, 150-159.
- BERCHE, P., GAILLARD, J. L. y RICHARD, S. (1988). Invasiveness and intracellular growth of Listeria monocytogenes. *Infect. Suppl.* 2, 145-148.
- BERCHE, P., GAILLARD, J. L., SANSONETTI, P., GEOFFROY, C. y ALOUF, J. E. (1987). Towards a better understanding of the molecular mechanisms of intracellular growth of Listeria monocytogenes. *Ann. Inst. Past. Microbiol.* 138, 242-245.
- BERENGUER, J., SOLERA, J., DIAZ, M. D., MORENO, S., LOPEZ-HERCE, J. A. y BOUZA, E. (1991). Listeriosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.* 13, 115-119.
- BILLE, J. (1988). Epidemiology of human listeriosis in Europe. Conferencia expuesta en el SIM, California, USA. 2-5 Octubre.
- BLANCO, M., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., DOMINGUEZ, L., BRIONES, V., VAZQUEZ, J. A., BLANCO, J. L., GARCIA, J. A. y SUAREZ, G. (1989). A technique for the direct identification of haemolytic-pathogen listeria on selective plating media. *Let. Appl. Microbiol.* 9, 125-128.
- BLANCO, M. M., DOMINGUEZ, L. y VAZQUEZ, J. A. (1993). Listeria: Detección e identificación. En "Listeria en alimentos. Conferencia Consenso", pp. 61-80. Ed. Mº Sanidad y Consumo. León.
- BLENDEN, D. C., KAMPELMACHER, E. H. y TORRES-ANJEL, M. J. (1987). Zoonosis update. Listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191, 1546-1552.

- BLENDEN, D. C. y SZATALOWICH, F. T. (1967). Ecologic aspects of listeriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 151, 1761-1766.
- BLODGETT, D. J., SCHURIG, G. G. y KORNEGAY, E. T. (1986). Immunomodulation in weanling swine with dietary selenium. Am. J. Vet. Res. 47, 1517-1519.
- BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. y HENDERSON, J. A. (1986). "Veterinary medicine". Ed. Baillière Tindall. Londres.
- BOYNE, R. y ARTHUR, J. R. (1990). Anaemia and changes in erythrocyte morphology associated with copper and selenium deficiencies and dietary restriction in rats. Res. Vet. Sci. 49, 151-156.
- BRACEGIRDLE, P., FITZGEORGE, R. B., WEST, A. A. y BASKERVILLE, A. (1992). A study of the pathogenesis of virulent and avirulent strains of Listeria monocytogenes when infected via intragastric or aerosol routes. Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen) 241-242.
- BRACKET, R. E. (1988). Presence and persistence of L. monocytogenes in food and water. Food Technol. April, 162-164.
- BRAUN, U., FORRER, R., FÜRER, W. y LUTZ, H. (1991). Selenium and vitamin E in blood sera of cows from farms with increased incidence of disease. Vet. Rec. 128, 543-547.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. y SMITH, N. T. (1957). En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", pp. 597-599. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- BRIONES, V. (1990). Estudio de un método indirecto para el diagnóstico de la listeriosis. Tesis Doctoral. Fac. Veterinaria, U.C.M.
- BRIONES, V. (1993). Factores del hospedador que determinan la susceptibilidad a la listeriosis. En "Listeria en alimentos. Conferencia Consenso", pp. 95-100. Ed. M^o Sanidad y Consumo. León.
- BRIONES, V., BLANCO, M. M., MARCO, A., PRATS, N., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., SUAREZ, G., DOMINGO, M. y DOMINGUEZ, L. (1992). Biliary excretion as possible origin of Listeria monocytogenes in fecal carriers. Am. J. Vet. Res. 53, 191-193.
- BROSCH, R., CATIMEL, B., BUCHRIESER, C. y ROCOURT, J. (1992). Virulence evaluation of L. monocytogenes strains, isolated from humans, food and animals in immunocompetent mice. Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen) 95-96.
- BRUNT, L. M., PORTNOY, D. A. y UNANNE, E. R. (1990). Presentation of Listeria monocytogenes to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. J. Immunol. 145, 3540-3546.
- BRYNER, J., WELEY, I. y VAN DER MAATEN, M. (1989). Research of listeriosis in milk cows with intramammary inoculation of Listeria monocytogenes. Acta Microbiol. Hung. 36, 137-140.
- BURN, C. G. (1935). Characteristics of a new species of the genus Listerella obtained from human sources. J. Bacteriol. 30, 373- .
- BURN, C. G. (1936). Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus Listerella. Am. J. Pathol. 12, 341-348.
- CAIN, D. B. y MCCANN, V. L. (1986). An unusual case of cutaneous listeriosis. J. Clin. Microbiol. 23, 976-977.

- CARVAJAL, A., SAMUELSSON, S., ROTHGARDT, N. P. y FREDERIKSEN, W. (1989). The treatment of Listeria monocytogenes infections in the Central Nervous System. *Acta Microbiol. Hung.* 36, 159-164.
- CHANDRA, R. K. (1985). Effect of macro- and micronutrient deficiencies and excesses on immune response. *Food Technol.* Feb., 91-93.
- CHANDRA, R. K. (1989). Nutritional regulation of immunity and risk of illness. *Indian J. Pediatr.* 56, 607-611.
- CHARLTON, K. M. y GARCIA, M. M. (1977). Spontaneous listeric encephalitis and neuritis in sheep. Light microscopic studies. *Vet. Pathol.* 14, 297-313.
- CHASTELLIER, C. H. y BERCHE, P. (1994). Fate of Listeria monocytogenes in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect. Immun.* 62, 543-553.
- CHEERS, C., MCKENZIE, I. F. C., PAVLOV, H., WAID, P. y YORK, J. (1978). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect. Immun.* 19, 763-770.
- CHEERS, C. y STANLEY, E. R. (1988). Macrophage production during murine listeriosis: Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1) and CSF-1 binding cells in genetically resistant and susceptible mice. *Infect. Immun.* 56, 2972-2978.
- CLEGG, F. G. (1975). Listeric infection and the genital system. *Proc. VIth International Symposium on the Problems of Listeriosis, (Nottingham)* 145-155.
- CLUFF, C. N., GARCIA, M. y ZIEGLER, H. K. (1990). Intracellular hemolysin-producing Listeria monocytogenes strains inhibit macrophage-mediated antigen processing. *Infect. Immun.* 58, 3601-3612.
- COLNAGO, G. L., JENNSSEN, L. S. y LONG, P. L. (1984a). Effect of selenium on peripheral blood leucocytes of chickens infected with Eimeria. *Poultry Sci.* 63, 896-903.
- COLNAGO, G. L., JENNSSEN, L. S. y LONG, P. L. (1984b). Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poultry Sci.* 63, 1136-1143.
- CONLAN, J. W. y NORTH, R. J. (1991). Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174, 741-744.
- CONLAN, J. W. y NORTH, R. J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 179, 259-268.
- CONLAN, W. y NORTH, R. (1993). Neutrophil-mediated lysis of infected hepatocytes. *ASM News* 59, 563-567.
- COOPER, R. F., DENNIS, S. M. y HARRIS, J. O. (1973). Fractionation of Listeria monocytogenes serotype 5. *Am. J. Vet. Res.* 34, 1093-1099.
- COSSART, P. y MENGAUD, J. (1989). Listeria monocytogenes a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* 6, 463-474.
- COX, L. J. (1989). Prevention and control of Listeria in the food industry. En "Foodborne listeriosis", pp. 100-120. Ed. Behr's Verlag GmbH & Co. RFA.
- CUMMINS, C. S. y HARRIS, H. (1956). The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria

and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* 14, 583-600.

CZUPRYNSKI, C. J. (1994). Host defense against Listeria monocytogenes: implications for food safety. *Food Microbiol.* 11, 131-147.

CZUPRYNSKI, C. J., CANONO, B. P., HENSON, P. M. y CAMPBELL, P. A. (1985). Genetically determined resistance to listeriosis is associated with increased accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages which have enhanced listericidal activity. *Immunol.* 55, 511-518.

DECKER, C. F., SIMON, G. L., DIGIOIA, R. A. y TUAZON, C. U. (1991). Listeria monocytogenes infections in patients with AIDS: report of five cases and review. *Rev. Infect. Dis.* 13(3), 413-417.

DEHAUMONT, P. (1993). Listeria monocytogenes et alimentation en France. En *Listeria en alimentos*. Conferencia Consenso, pp. 39-53. Ed. M^o Sanidad y Consumo. León.

DESCHRYVER-KECSKEMETI, K.; BANCROFT, G. J.; BOSMA, G. C.; BOSMA, M. J. y UNANUE, E. R. (1988). Pathology of Listeria infection in murine severe combined immunodeficiency: a study by immunohistochemistry and electron microscopy. *Lab. Invest.* 58, 698-705.

DIJKSTRA, R. G (1987). Listeriosis in animals: clinical signs, diagnosis and treatment. En *Listeriosis*. Reunión de la OMS, Vet. Med. Hefte 5/1987,

DIJKSTRA, R. G. (1981). The occurrence of L. monocytogenes in surface water of canals and lakes, in ditches of one large polder and in the effluents and canals of sewage treatment plant. *Proc. VIIIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Madrid)*.

DOMINGO, M., MANCEBO, J., BLANCH, L., COLL, P., NET, A. y NOLLA, J. (1986). Meningitis por Listeria monocytogenes en adultos. Estudio de 10 casos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 178, 158-163.

DOMINGO, M., MARCO, A., PRATS, N., ALTIMIRA, J., BRIONES, V., BLANCO, A. y DOMINGUEZ, L. (1992). Intragastric inoculation of Listeria monocytogenes in the mouse. *Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen)* 247-248.

DOMINGO, M., MARCO, A. J., PRATS, N. y ALTIMIRA, J. (1993). Patogenia y patología comparada de la listeriosis. En *Listeria en alimentos*. Conferencia Consenso, pp. 157-162. Ed. M^o Sanidad y Consumo. León.

DOMINGUEZ, L. (1982). Aislamiento e identificación bacteriana en el género Listeria (Pirie 1940). Tesis Doctoral, Fac. Veterinaria, U.C.M.

DROKE, E. A. y LOERCH, S. C. (1989). Effects of parenteral selenium and vitamin E on performance, health and humoral immune response of steers new to the feedlot environment. *J. Anim. Sci.* 67, 1350-1359.

DUMONT, J. y COTONI, L. (1921). Bacille semblable à celui du rouget du porc rencontré dans le L.C.R. d'un méningitique. *Ann. Inst. Past.* 35, 625-633.

EMILE, J. y BAZIN, C. (1975). *Listeria* neuromeningitis in the adult. *Proc. VIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Nottingham)* pp. 164-172.

ERREBO-LARSEN, H. y JENSEN, J. (1979). Occurrence of bovine mastitis caused by L. monocytogenes. *Proc. VIIIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Sofia)*, pp. 211-219.

ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J., GRASSO, P. J. y SCHOLZ, R. W. (1989). Induction of Escherichia coli

mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. *Am. J. Vet. Res.* 50, 2093-2100.

ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J., HUTCHINSON, L. J. y SCHOLZ, R. W. (1987). Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. *JAVMA* 190, 1417-1421.

ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J. y SCHOLZ, R. W. (1990). Experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1107-1111.

ESKEW, M. L., ZARKOWER, A., SCHEUCHENZUBER, W. J., BURGESS, J. R., SCHOLZ, R. W., HILDENBRANDT, G. y REDDY, C. C. (1989). Effects of inadequate vitamin E and/or selenium nutrition on the release of arachidonic acid metabolites in rat alveolar macrophages. *Prostaglandins* 38, 79-89.

ESPAZE, E. P., GAUTREAU, D., CATIMEL, B., MIEGEVILLE, A. F., ROCOURT, J. y CORTIEU, A. L. (1989). An epidemiological survey of human listeriosis in France during 1987 using serotyping and phage-typing. *Acta Microbiol. Hung.* 36, 231-234.

FARBER, J. M. y PETERKIN, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476-511.

FENLON, D. R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 537-543.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. (1984). Microorganismos del género *Listeria* (Pirie 1940) en leche natural y pasterizada. Tesis Doctoral. Fac. Veterinaria. U.C.M.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., DOMINGUEZ, L., VAZQUEZ, J. A., BLANCO, J. L. y SUAREZ, G. (1986). *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. *Can. J. Microbiol.* 32, 149.

FLEMING, D. W., COCHI, S. L., MACDONALD, K. L., BRONDUM, J., HAYES, P. S., PLIKAYTIS, B. D., HOLMES, M. D., AUDURIER, A., BROOME, C. V. y REINGOLD, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Eng. J. Med.* 312, 404.

GAILLARD, J. L., BERCHE, P., MOUNIER, J., RICHARD, S. y SANSONETTI, P. (1987a). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55, 2822-2829.

GAILLARD, J. L., BERCHE, P., MOUNIER, J., RICHARD, S. y SANSONETTI, P. (1987b). Penetration of *Listeria monocytogenes* into the host: a crucial step of the infectious process. *Ann. Inst. Past. Microbiol.* 138, 259-264.

GALSWORTHY, S. B. (1987). Role of the cell surface in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Ann. Inst. Past. Microbiol.* 138, 241-284.

GARCIA, J. A., DOMINGUEZ, L., BRIONES, V., BLANCO, M., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. y SUAREZ, G. (1990). Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 113-120.

GILL, D. A. (1933). Circling disease: a meningoencephalitis of sheep in New Zealand. Notes on a new species of pathogenic organism. *Austral. Vet. J.* 89, 258-270.

GILL, D. A. (1937). Ovine bacterial encephalitis (Circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Austral. Vet. J.* 13, 46-56.

GITTER, M. (1979). *Listeria monocytogenes* infection in bovine abortion. *Proc. VIIth International Symposium on*

the Problems of Listeriosis (Sofia) pp. 193-204.

GITTER, M. (1985). Listeriosis in farm animals in Great Britain. En "Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance" (eds. Collins, C. H. y Grange, J. M.), pp. 191-200. Ed. Academic Press. Londres.

GITTER, M., STEBBINGS, R. STJ., MORRIS, J. A., HANNAM, D. y HARRIS, C. (1986). Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. Vet. Rec. 118, 207-208.

GOLNAZARIAN, C. A., DONNELLY, C. W., PINTAURO, S. J. y HOWARD, D. B. (1989). Comparison of infectious dose of Listeria monocytogenes F5817 as determinant for normal versus compromised C57B1/6j mice. J. Food Prot. 52, 696-701.

GOOSENS, P. L., MARCHAL, G. y MILON, G. (1988). Early influx of Listeria-reactive T lymphocytes in liver of mice genetically resistant to listeriosis. J. Immunol. 141, 2451-2455.

GOULET, V., ESPAZE, E., BASTIDE, I. y REVIERE, I. (1989). Human listeriosis in France in 1987. Acta Microbiol. Hung. 36, 173-176.

GOMEZ MAMPASO, E. (1993). Listeriosis humana: grupos de riesgo y portadores. En "Listeria en alimentos. Conferencia Consenso", pp. 141-144. Ed. M^o Sanidad y Consumo. León.

GOMEZ MAMPASO, E., TERUEL, J. L., CASCALES, P., GARCIA MARTIN, F., BAQUERO, F. y ORTUÑO, J. (1987). Portadores fecales de Listeria y transplante renal. Rev. Esp. Microbiol. Clín. 2, 99-101.

GRAY, M. L. y KILLINGER, A. H. (1966). L. monocytogenes and listeric infections. Bacteriol. Rev. 30, 309-373.

GREENSPAN, H. C. y ARUOMA, O. I. (1994). Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. Immunol. Today 15, 209-213.

GROVES, R. D. y WELSHIMER, H. J. (1977). Separation of pathogenic from apathogenic Listeria monocytogenes by three in vitro reactions. J. Clin. Microbiol. 5, 559-563.

GYANG, E. O., STEVENS, J. B., OLSON, W. G., TSITSAMIS, S. D. y USENIK, E. A. (1984). Effects of selenium-vitamin E injection on bovine polymorphonucleated leukocytes phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus. Am. J. Vet. Res. 45, 175-177.

HANG, C. E., GILL, R. G., BABCOCK, S. K., LAFFERTY, K. J., BELLGRAU, D. y WEIL, R. (1987). Cyclosporine-induced tolerance requires antigens capable of initiating an immune response. J. Immunol. 139, 2947-2949.

HARRINGTON-FOWLER, L., HENSON, P. M. y WILDER, M. S. (1981). Fate of Listeria monocytogenes in resident and activated macrophages. Infect. Immun. 33, 11-16.

HASSAN, S., HAKKARAINEN, J., JONSON, L. y TYOPPONEN, J. (1990). Histopathological and biochemical changes associated with selenium and vitamin E deficiency in chicks. J. Vet. Med. 37, 708-720.

HIGGINBOTHAM, J. N., LIN, T. L. y PRUETT, S. B. (1992). Effect of macrophage activation on killing of Listeria monocytogenes. Roles of reactive oxygen or nitrogen intermediates, rates of phagocytosis, and retention of bacteria in endosomes. Clin. Exp. Immunol. 88, 492-498.

HILL, C. H. (1975). Interrelationships of selenium with other trace elements. Fed. Proc. 34, 2096-2100.

- HIRD, D. W. (1987). Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J. of Food Prot.* 50, 429-433.
- HIRD, D. W. y GENIGEORGIS, C. (1990). Listeriosis in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct (nonfoodborne) infection for humans. En "Foodborne Listeriosis" (eds. Miller, A. J., Smith, J. L. y Somkuti, G. A.), pp. 31-39. Ed. Elsevier. Amsterdam.
- HO, J. L., SHANDS, K. N., FRIEDLAND, G., ECKIND, P. y FRASER, D. W. (1986). An outbreak of 4b-type L. monocytogenes infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146, 520.
- HOF, H. y HEFNER, P. (1988). Pathogenicity of Listeria monocytogenes in comparison to other Listeria species. *Infect. Suppl.* 2, 141-144.
- HÜLPHERS, G. (1911). Lefvermekros hos kanin orsakad af en ej förnt beskrifven bakterie. *Sven. Vet. Tidskrift.* 2, 265-273.
- HYSLOP, N. S. G. (1975). Epidemiologic and immunologic factors in listeriosis. *Proc. VIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Nottingham)*.
- IVANOV, I. (1957). Listériose chez les ovins et les caprins. *Bull. Off. Int. Epiz.* 48, 571-583.
- IVANOV, I. (1962). Untersuchungen über die Listerioseder Schafein Bulgarien. *Monaths. Veterinaarmed.* 17, 729-736.
- IVANOV, I. (1975). Establishment of non-motile strains of Listeria monocytogenes type 5. En "Problems of listeriosis" (ed. Woodbine, M.), pp. 18-26. Leicester University Press.
- JAMES, S. M., FANNIN, S. L., AGEE, B. A., GALL, B., PARKER, E., VOGT, J., RUN, G., WILLIAMS, J., LIEB, J., PREDERGAST, T., WERNER, S. B. y CHIN, J. (1985). Listeriosis outbreak associated with Mexican-style-cheese in California. *Morbid. Mortal. Weekly Rept.* 34, 357.
- JELINEK, P. D., ELLIS, T., WROTH, R. H., SUTHERLAND, S. S., MASTERS, H. G. y PETTERSON, D. S. (1988). The effect of selenium supplementation on immunity, and the establishment of an experimental Haemonchus contortus infection, in weaner Merino sheep fed a low selenium diet. *Austral. Vet. J.* 65, 214-217.
- JONES, D. (1975). A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 87, 52-96.
- JONES, D. (1988). The place of Listeria among gram-positive bacteria. *Infect. Suppl.* 2, 85-88.
- JONES, D., COLLINS, M. D., GOODFELLOW, M. y MINNIKIN, D. E. (1979). Chemical studies in the classification of the genus Listeria and probably related bacteria. *Proc. VIIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Sofia)* pp. 17-24.
- JONES, D., FERESU, S. B. y COLLINS, M. D. (1986). Classification and identification of Listeria, Brochothrix and Erysipelothrix. En "Listeria-Listeriosis" (eds. Courtieu, A. L., Espaze, E. P. y Reynaud, A. E.), pp. 29-34. Ed. Universidad de Nantes. Nantes.
- JURADO, R. L., FARLEY, M. M., PEREIRA, E., HARVEY, R. C., SCHUCHAT, A., WENGER, J. D. y STEPHENS, D. S. (1993). Increased risk of meningitis and bacteremia due to Listeria monocytogenes in patients with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 17, 224-227.
- KAMPELMACHER, E. H. y JANSEN, N. (1975). Ocurrance of L. monocytogenes in effluents. *Proc. VIth International Symposium on Problems of Listeriosis (Nottingham)*.

- KAMPELMACHER, E. H. y NOORLE JANSEN, L. M. (1969). Isolation of L. monocytogenes from feces of clinically healthy humans and animals. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.* 221, 353-359.
- KANDLER, O. y WEISS, N. (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods. En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (eds. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G.), pp. 1208-1209. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- KAUTTER, D. A., SILVERMAN, S. J., ROESSLER, W. G. y DRAWDY, J. F. (1963). Virulence of L. monocytogenes for experimental animals. *J. of Infect. Dis.* 112, 167-180.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., ROY, M., WISHE, H. I., COHEN, M. W. y STOTZKY, G. (1990). Selenium and immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. *P.S.E.B.M.* 193, 136-142.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., ROY, M., WISHE, H. I., COHEN, M. W. y STOTZKY, G. (1992). Regulation of cellular immune responses by selenium. *Biol. Trace Elements Res.* 33, 23-35.
- KOLLER, L. D. y EXON, J. H. (1986). The two faces of selenium- deficiency and toxicity- are similar in animals and man. *Can. J. Vet. Res.* 50, 297-306.
- KONGSHAVEN, P. A. L. y SKAMENE, E. (1984). The role of natural resistance in protection of the murine host from listeriosis. *Clin. Invest. Med.* 7, 253.
- KOS, W. L., KOS, K. A. y KAPLAN, A. M. (1984). Impaired function of immune reactivity to Listeria monocytogenes in diet-fed mice. *Infect. Immun.* 43, 1094-1096.
- KRATZ, S. S. y KURLANDER, R. J. (1988). Characterization of the pattern of inflammatory cell influx and cytokine production during the murine host response to Listeria monocytogenes. *J. Immunol.* 141, 598-606.
- KUHN, M., KATHARIOU, S. y GOEBEL, W. (1988). Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium Listeria monocytogenes. *Infect. Immun.* 56, 79-82.
- LALLEMAND, A. V., GAILLARD, D. A., PARADIS, P. H. y CHIPPAUX, C. G. (1992). Fetal listeriosis during the second trimester of gestation. *Pediatr. Pathol.* 12, 665-671.
- LARSEN, S. A. y JONES, W. (1972). Evaluation and standardization of an agglutination test for human listeriosis. *Appl. Microbiol.* 24, 101-107.
- LARSON, S. (1979). Clinical differences in neonatal listeriosis acquired in utero versus extramaternally. *Proc. VIIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Sofia)* pp. 170-172.
- LEE, W. H. y MCLAIN, D. (1986). Improved Listeria monocytogenes selective agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1215-1217.
- LENNON, D., LEWIS, B., MANTELL, C., BECROFT, D., DOVE, B., FARMER, K., TONKIN, S., YEATS, N., STAMP, R. y MICKELSON, K. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3, 30.
- LOESSNER, M. J. y BUSSE, M. (1990). Bacteriophage typing of Listeria species. *Appl Environ. Microbiol.* 56, 1912-1918.
- LOPEZ, M. B.; BRIONES, V.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; BLANCO, M. M.; GARCIA, J. A.; DELGADO, M. C.; DOMINGO, M. y DOMINGUEZ, L. (1992). Serological response in rabbits to oral inoculation with Listeria monocytogenes. *Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen)*

- LOPEZ, M. B.; BRIONES, V.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; GARCIA, J. A.; BLANCO, M. M.; SUAREZ, G. y DOMINGUEZ, L. (1993). Serological response in rabbits to Listeria monocytogenes after oral or intragastric inoculation. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 7, 131-134.
- LORBER, B. (1990). Clin. listeriosis- implications for pathogenesis. En "Foodborne listeriosis" (eds. Miller, A. J., Smith, J. L. y Somkuti, G. A.), pp. 41-49. Ed. Elsevier. Amsterdam.
- LOVETT, J. (1988). Isolation and identification of Listeria monocytogenes in dairy products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 658-660.
- LOVETT, J. (1989). Listeria monocytogenes. En "Foodborne bacterial pathogens" (ed. Doyle, M. P.). Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- LOW, J. C. y DONACHIE, W. (1991). Clinical and serum antibody responses of lambs to infection by Listeria monocytogenes. Res. Vet. Sci. 51, 185-192.
- LOWRY, P. D. y TIONG, I. (1988). The incidence of Listeria monocytogenes in meat and meat products: factors affecting distribution. Proc. 34th International Congress of Meat Science and Technology, Brisbane, Australia.
- LUFT, B. J. y REMINGTON, J. S. (1982). Effect of pregnancy on resistance to Listeria monocytogenes and Toxoplasma gondii infections in mice. Infect. Immun. 38, 1164-1171.
- MACDONALD, T. T. y CARTER, P. B. (1980). Cell-mediated immunity to intestinal infection. Infect. Immun. 28, 516-523.
- MAINOU-FOWLER, T., MACGOWAN, A. P. y POSTLEHWAITE, R. (1988). Virulence of Listeria spp.: Course of infection in resistant and susceptible mice. J. Med. Microbiol. 27, 131-140.
- MANDEL, T. E. y CHEERS, C. (1980). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. Infect. Immun. 30, 851-861.
- MARCO, A., DOMINGO, M., PRATS, N., BRIONES, V., PUMAROLA, M. y DOMINGUEZ, L. (1991). Pathogenesis of lymphoid lesions in murine experimental listeriosis. J. Comp. Pathol. 105, 1-15.
- MARCO, A., DOMINGO, M., RUBERTE, J., CARRETERO, A., BRIONES, V. y DOMINGUEZ, L. (1992a). Lymphatic drainage of Listeria monocytogenes and indian ink inoculated in the peritoneal cavity of the mouse. Lab. Anim. 26, 200-205.
- MARCO, A., PRATS, N., RAMOS, J. A., BRIONES, V., BLANCO, M., DOMINGUEZ, L. y DOMINGO, M. (1992b). A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of Listeria monocytogenes in mice. J. Comp. Pathol. 107, 1-9.
- MARTH, E. H. (1988a). Disease characteristics of L. monocytogenes. Food Technol. April, 165-168.
- MARTH, E. H. (1988b). Occurrence of Listeria in foods: milk and dairy products. Conferencia expuesta en el SIM. Red Lion Inn, California, USA. 2-5 Octubre.
- MCLAUCHLIN, J. (1987). Listeria monocytogenes. recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J. Appl. Bacteriol. 63, 1-11.
- MCLAUCHLIN, J. (1990). Distribution of serovars of Listeria monocytogenes isolated from different categories of patients with listeriosis. Europ. J. Comp. Microbiol. Infect. Dis. 9, 210-213.

- MERO, E. y STEUER, W. (1981). Occurrence of L. monocytogenes in effluent of sewage treatment plants and in receiving body river water. Proc. VIIIth International Symposium on Problems of Listeriosis (Madrid).
- MEYER, D. H., BUNDUKI, M., BELIVEAN, C. M. y DONNELLY, C. W. (1992). Differences in invasion and adherence of Listeria monocytogenes with mammalian gut cells. Food Microbiol. 9, 115-126.
- MIELKE, M. E. A., EHLERS, S. y HAHN, H. (1993). The role of cytokines in experimental listeriosis. Immunobiol. 189, 285-315.
- MIKI, K. y MACKANESS, G. B. (1964). The passive transfer of acquired resistance to Listeria monocytogenes. J. Exp. Med. 120, 93-103.
- MILLER, E. R. (1985). Mineral x disease interactions. J. Anim. Sci. 60, 1500-1507.
- MILLER, J. K. y BURNS, J. (1970). Histopathology of Listeria monocytogenes after oral feeding to mice. Appl. Microbiol. 19, 772-775.
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A. y SWANN, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes. J. Pathol. Bacteriol. 29, 407-439.
- MURRAY, J. M. y MURRAY, A. B. (1985). The effects of selenium deficiency and repletion on host resistance to infection. En "Trace elements in man and animals", pp. 244-247. Ed. Commonwealth Agricultural Bureau. Cambridge.
- NAKANE, A., MINAGAWA, T. y KATO, K. (1988a). Endogenous tumor necrosis factor (Cachectin) is essential to host resistance against Listeria monocytogenes infection. Infect. Immun. 56, 2563-2569.
- NAKANE, A., MINAGAWA, T., YASUDA, I., YU, C. y KATO, K. (1988b). Prevention by gamma interferon of fatal infection with Listeria monocytogenes in mice treated with cyclosporin A. Infect. Immun. 56, 2011-2015.
- NAKANE, A., MINAGAWA, T., KOHANAWA, M., CHEN, Y., SATO, H., MORIYAMA, M. y TSURUOKA, N. (1989). Interactions between endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor in host resistance against primary and secondary Listeria monocytogenes infections. Infect. Immun. 57, 3331-3337.
- NOTERMANS, S. y CHAKRABORTY, T. (1992). Pathogenicity of Listeria monocytogenes: Protection acquired by infection. Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen) 78-79.
- NYFELDT, A. (1932). Klinische und experimentelle untersuchungen über die Mononucleosis infectiosa. Folia Haematol. Leipzig 47, 1-44.
- ORTEL, S. (1989a). Listeria-meningitis and -septicaemia in immunocompromised patients. Acta Microbiol. Hung. 36, 153-158.
- ORTEL, S. (1989b). Further results and experiences with phage-typing of Listeria. Acta Microbiol. Hung. 36, 219-224.
- OTTER, A. y BLAKEMORE, W. F. (1989). Observations on the presence of Listeria monocytogenes in axons. Acta Microbiol. Hung. 36, 125-132.
- PIRIE, J. H. H. (1927). A new disease of veldt rodents. "Tiger River Disease". Publ. S. African Inst. Med. Res. 3, 163-186.

- PIRIE, J. H. H. (1940). Listeria: change of name for a genus of bacteria. *Nature* 145, 264.
- POHJANVIRTA, R. y HUTTUNEN, T. (1985). Some aspects of murine experimental listeriosis. *Acta Vet. Scand.* 26, 563-580.
- PORTNOY, D. A. (1992). Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis. *Infect. Immun.* 60, 1263-1267.
- PRATS, N., BRIONES, V., BLANCO, M. M., ALTIMIRA, J., RAMOS, J. A., DOMINGUEZ, L. y MARCO, A. (1992a). Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with Listeria monocytogenes. *Europ. J. Comp. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 5-8.
- PRATS, N., BRIONES, V., MARCO, A., DOMINGO, M., DOMINGUEZ, L., BLANCO, M. M. y ALTIMIRA, J. (1992b). Choroiditis and meningitis are late lesions in experimental murine infection with Listeria monocytogenes. *Proc. XIth International Symposium on the Problems of Listeriosis (Copenhagen)* 253-254.
- PUNG, O. J., TUCKER, A. N., VORE, S. J. y LUSTER, M. (1985). Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to Listeria monocytogenes correlates with depressed production of interleukin-2. *Infect. Immun.* 50, 91-96.
- RALOVICH, B. (1975). Selective and enrichment media to isolate Listeria. En "Problems of listeriosis", ed. WOODBINE, M., pp. 286-294. Leicester University Press.
- RALOVICH, B. (1984a). Listeriosis research. Present situation and perspective. *Akademiai Kiado, Budapest.*
- RALOVICH, B. (1984b). What is the role of food-stuffs in transportation of Listeria. En "Microbial associationn and interactions in food", pp. 99. Ed. Akademiai Kiado. Budapest.
- REFFERT STABEL, J., SPEARS, J. W., BROWN, T. T. y BRAKE, J. (1989). Selenium effects on glutathione peroxidase and the immune response of stressed calves challenged with Pasteurella hemolytica. *J. Anim. Sci.* 67, 557-564.
- REISS, H. J.; POTEL, J. y KREBS, A. (1951). Granulomatosis infantiseptica. *Z. Gesantz. Inn. Med.* 6, 1-7.
- RIBIERE, O., COUTAREL, P., JARLIER, V., BOUSQUET, O., BALDERACCHI, U., LECOUTURIER, J. P. y THERVET, F. (1990). Abces du foie a Listeria monocytogenes. Chez une malade diabetique. *Presse Med.* 19, 1538-1540.
- RIDGWAY, E. J. y BROWN, J. M. (1989). Listeria monocytogenes meningitis in the acquired immunodeficiency syndrome: limitations of conventional typing methods in tracing a foodborne source. *J. Infect.* 19, 167-171.
- ROCOURT, J. (1988). Taxonomy of the genus Listeria. *Infect. Suppl.* 2 16, 89-91.
- ROCOURT, J., GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D. y SEELIGER, H. P. R. (1982). DNA relatedness among serovars of Listeria monocytogenes sensu lato. *Curr. Microbiol.* 7, 383-388.
- ROCOURT, J. y SEELIGER, H. P. R. (1985). La listériose: une infection hospitalière? *Méd. Mal. Infect.* 12, 721-725.
- ROCOURT, J., WEHMEYER, V. y STACKEBRANDT, E. (1987). Transfer of Listeria denitrificans to a new genus Jonesia gen. nov. as Jonesia denitrificans comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 266-270.

- ROCOURT, J. y CATIMEL, B. (1989). International Phage Typing Center for Listeria: report for 1987. Acta Microbiol. Hung. 36, 225-230.
- ROCOURT, J., BOERLIN, P., GRIMONT, F., JACQUET, C. y PIFFARETTI, J. C. (1992). Assignment of Listeria grayi and Listeria murrayi to a single species, Listeria grayi, with a revised description of Listeria grayi. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 171-174.
- ROLL, J. T. y CZUPRYNSKI, C. J. (1990). Hemolysin is required for extraintestinal dissemination of Listeria monocytogenes in intragastrically inoculated mice. Infect. Immun. 58, 3147-3150.
- ROY, M., KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., WISHE, H. I., COHEN, M. W. y STOTZKY, G. (1992). Effect of selenium on the expression of high affinity interleukin 2 receptors. P.S.E.B.M. 200, 36-43.
- ROY, M., KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., WISHE, H. I., COHEN, M. W. y STOTZKY, G. (1993). Selenium supplementation enhances the expression of interleukin 2 receptor subunits and internalization of interleukin 2. P.S.E.B.M. 202, 295-301.
- SAUNDERS, N. A., RIDLEY, A. M. y TAYLOR, A. G. (1989). Typing of Listeria monocytogenes for epidemiological studies using DNA probes. Acta Microbiol. Hung. 36, 205-209.
- SCHLECH, W. F. (1990). Listeria, animals and man: aspects of virulence. En "Foodborne listeriosis" (eds. Miller, A. J., Smith, J. L. y Somkuti, G. A.). Ed. Elsevier, Amsterdam.
- SCHLECH, W. F., LAVIGNE, P. M., BORTOLUSSI, R. A., ALLEN, A. C., HALDANE, E. V., HIGHTOWER, A. W., JOHNSON, S. E., KING, S. H., NICHOLLS, E. S. y BROOME, C. V. (1983). Epidemic listeriosis: evidence of transmission by food. New Eng. J. Med. 308, 203.
- SCHLECH, W. F., CHASE, D. P. y BADLEY, A. (1986). A rat model of Listeria monocytogenes infection via the oral route: development and effect of the gastric acidity on infective dose. Proc. 26th Annual ASM Meeting, New Orleans.
- SCHMIDT, N.J. y EMMONS, R.W. (1989). General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. En "Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections" (eds. Schmidt, N.J. y Emmons, R.W.), Ed. American Public Health Association. Washington DC.
- SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B. y BROOME, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4, 169-183.
- SCHULTZ, E. W.; TERRY, M. C.; BRICE, A. T. y GEBHARDT, L. P. (1934). Bacteriological observations on a case of meningo-encephalitis. PSEBM 3, 1021-1023.
- SEELIGER, H. P. R. (1952). Zur ätiologie der Granulomatosis infantiseptica und pseudotuberkulöser Erkrankungen. Dtsch. Med. Wochenschr. 77, 587- .
- SEELIGER, H. P. R. (1961). Listeriosis. Ed. Hafner Pub. Co. Nueva York.
- SEELIGER, H. P. R. (1975). The context of listeriosis. En "Problems of listeriosis" (ed. Woodbine, M.). pp. 1-3. Leicester University Press.
- SEELIGER, H. P. R. (1976). Notion actuelle sur l'épidémiologie de la listériose. Med. Mal. Infect. 8-9bis, 6-14.
- SEELIGER, H. P. R. (1981). Apathogene listerien: Listeria innocua sp. nov. (Seeliger et Scoofs 1977). Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt.1 Orig. Reihe A 249, 487-493.

- SEELIGER, H. P. R. (1987). Classification and pathogenicity of Listeria. In Listeriosis. Reunión de la OMS, Vet. Med. Hefte 5/1987.
- SEELIGER, H. P. R. y SULZBACHER, F. (1956). Antigenic relationships between Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. 2, 220-231.
- SEELIGER, H. P. R. y WELSHIMER, H. J. (1974). Genus Listeria. En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (eds. Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E.), pp. 593-596. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- SEELIGER, H. P. R. y HÖHNE, K. (1979). Serotyping of L. monocytogenes and related species. En "Methods in Microbiology" vol. 13, pp. 31-49. Ed. Academic Press. Londres.
- SEELIGER, H. P. R. y SCHOOFS, M. (1979). Serological analysis of non-hemolyzing Listeria-strain belonging to a specie different from Listeria monocytogenes. Proc. VIIth International Symposium on the problems of Listeriosis (Sofia) 24-28.
- SEELIGER, H. P. R., ROCOURT, J., SCHRETTENBRUNNER, A., GRIMONT, P. A. D. y JONES, D. (1984). Listeria ivanovii sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337.
- SEELIGER, H. P. R. y JONES, D. (1986). Genus Listeria Pirie 1940. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" vol.2, pp. 1235-1245. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- SERFASS, R. E. y GAUTHER, H. E. (1975). Defective microbicidal activity in glutathione peroxidase-deficient neutrophils of selenium-deficient rats. Nature 255, 640-641.
- SIDDIQUE, C. H., MCKENZIE, B. E., SAPPI, W. J. y RICH, P. (1985). Light and electron microscopic study of the livers of pregnant mice infected with Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res. 39, 887-892.
- SKOVGAARD, N. y MORGEN, C. A. (1988). Detection of Listeria spp. in faeces from animals, in feeds and in raw food of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 6, 229-242.
- SORDILLO, L. M., HICKS, C. R., WILSON, R. y MADDOX, J. (1993). Effects of selenium status on bovine mononuclear cell function. J. Vet. Med. 40, 615-623.
- SPALLHOLZ, J. E., BOYLAN, L. M. y LARSEN, H. S. (1990). Advances in understanding selenium's role in the Immune System. Annals of the New York Academy of Sciences 587, 123-139.
- STAMM, A. M., DISMUKES, W. E., SIMMONS, B. P., COBBS, C. G., ELLIOT, A., BUDRICH, P. y HARMAN, H. (1982). Listeriosis in renal transplant recipients: report of an outbreak and review of 102 cases. Rev. Infect. Dis. 4, 665-684.
- STELMA, G. N., REYES, A. L., PEELER, J. T., FRANCIS, D. W., HUNT, J. M., SPAULDING, P. L., JOHNSON, J. L. y LOVETT, J. (1987). Pathogenicity test for Listeria monocytogenes using immunocompromised mice. J. Clin. Microbiol. 25, 2085-2089.
- STUART, S. E. y WELSHIMER, H. J. (1973). Intrageneric relatedness of Listeria Pirie. Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 8-14.
- STUART, S. E. y WELSHIMER, J. J. (1974). Taxonomic reexamination of Listeria Pirie and transfer of L. grayi and L. murrayi to a new genus Murrava. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 177-185.
- SUAREZ, G. (1991). Epidemiología de la listeriosis. Anales de la Real Academia Nacional de Medicina. Tomo CVIII, pp.***

- TABOURET, M., DE RYCKE, J., AUDURIER, A. y POUTREL, B. (1991). Pathogenicity of Listeria monocytogenes isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. J. Med. Microbiol. 34, 13-18.
- TEIGE, J., LARSEN, H. J. y TOLLERSRUD, S. (1984). Swine dysentery: the influence of dietary selenium on clinical and pathological effects of Treponema hyodysenteriae infection. Acta Vet. Scand. 25, 1-9.
- TILNEY, L. G. y TILNEY, M. S. (1993). The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by Listeria. Trends Microbiol. 1, 25-31.
- TURNER, R. J. y FINCH, J. M. (1991). Selenium and the immune response. Proc. Nut. Soc. 50, 275-285.
- VAN VLEET, J. F., BOON, G. D. y FERRANS, V. J. (1981). Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in weanling swine fed silver, cobalt, tellurium, zinc, cadmium, and vanadium. Am. J. Vet. Res. 42, 789-799.
- VAN VLEET, J. F., REBAR, A. H. y FERRANS, V. J. (1977). Acute cobalt and isoproterenol cardiotoxicity in swine: protection by selenium-vitamin E supplementation and potentiation by stress-susceptible phenotype. Am. J. Vet. Res. 38, 991-1002.
- VAZQUEZ, J. A. (1989). Citolisinas de los microorganismos del género Listeria. Tesis Doctoral. Fac. Veterinaria, U.C.M.
- VAZQUEZ, J. A., DOMINGUEZ, L., FERNANDEZ, J. F., BLANCO, J. L., GOMEZ-LUCIA, E., BRIONES, V. y SUAREZ, G. (1988). Serological studies on L. grayi and L. murrayi. J. Appl. Bacteriol. 64, 371-378.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; DOMINGUEZ, L.; BLANCO, M.; ROCOURT, J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; GUTIERREZ, C. B.; TASCÓN, R. I.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F. (1992). Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new Listeria-selective enumeration medium and phage typing. Am. J. Vet. Res. 53, 368-371.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A. (1984). Anticuerpos producidos en conejos inoculados con distintas especies del género Listeria. Tesina de Licenciatura. Fac. Veterinaria, U.C.M.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A., FERRER, D. y ROCOURT, J. (1991). Heterogeneidad de las cepas de Listeria monocytogenes aisladas de un brote de listeriosis humana ocurrido en Valencia en 1989. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. 9, 442-444.
- WATKINS, J. y SLEATH, K. P. (1981). Isolation and enumeration of L. monocytogenes from sewage, sewage sludge and river water. J. Appl. Bacteriol. 50, 1-9.
- WEIS, J. (1975). The incidence of L. monocytogenes on plants and soil. Proc. VIth International Symposium on Problems of Listeriosis (Nottingham).
- WEIS, J. y SEELIGER, H. P. R. (1975). Incidence of L. monocytogenes in nature. Appl. Microbiol. 30, 29-32.
- WELSHIMER, H. J. (1968). Isolation of L. monocytogenes from vegetation. J. Bacteriol. 95, 300-303.
- WELSHIMER, H. J. y DONKER-VOET, J. (1971). L. monocytogenes in nature. Appl. Microbiol. 21, 516-519.
- WELSHIMER, H. J. y MEREDITH, A. L. (1971). Listeria murrayi sp. nov.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting Listeria. Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 3-7.
- WILKINSON, B. J. y JONES, D. (1977). A numerical taxonomic survey of Listeria and related bacteria. J. Gen.

Microbiol. 98, 399-421.

WILKINSON, T. R. y HALL, E. R. (1971). Survival of L. monocytogenes in experimentally infected mice. Appl. Microbiol. 21, 108-111.

ZACHARA, B. A., MIKOLAJCZA, J. y TRAFIKOWSKA, U. (1993). Effect of various selenium (Se) intakes on tissue Se levels and glutathione peroxidase activities in lambs. J. Vet. Med. 40, 310-318.

ZYCHLINSKY, A., KENNY, B., MÉNARD, R., PRÉVOST, M. C., HOLLAND, I. B. y SANSONETTI, P. J. (1994). IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri. Mol. Microbiol. 11, 619-627.